

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA**  
**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT**



## **TESIS DE MAESTRIA**

**ESTRUCTURA POBLACIONAL DE BACTERIAS SULFATO  
REDUCTORAS Y ARQUEAS METANOGENAS EN PERFILES  
SEDIMENTARIOS DE LAGUNAS DE AGUAS BLANCAS Y AGUAS  
NEGRAS DE LA CUENCA AMAZÓNICA DEL RÍO BENI**

**POSTULANTE:**

Lic. KARINA SALAZAR CHAVEZ

**TUTORES:**

VOLGA IÑIGUEZ *Ph.D.*  
MARC ROULET *Ph.D.* †

**LA PAZ - BOLIVIA**

**2008**

## DEDICADO

Con mucho cariño y eterna gratitud a nuestro Creador, a mis padres Valerio y Julia, mi hermano Gary, por el constante apoyo, comprensión y sobre todo por el cariño y la confianza que depositaron en mi persona.

Vengan a mí todos ustedes que están cansados de sus trabajos y cargas, y yo les haré descansar. Acepten el yugo que les pongo, y aprendan de mí, que soy paciente y de corazón humilde; así encontrarán descanso. Porque el yugo que les pongo y la carga que les doy a llevar son ligeros.

**Mt. 11. 28-31.**

## AGRADECIMIENTOS

A nuestro padre Dios, por el don de la vida que nos permite luchar por conseguir nuestros sueños y anhelos, además de conocer y compartir momentos invaluablemente juntos a otras personas.

A mi tutora PhD. Volga Iñiguez R., por sus valiosos consejos y enseñanzas, a todos los compañeros del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, por haberme apoyado en la elaboración de este trabajo.

Un reconocimiento especial y mi eterna gratitud al PhD. Marc Roulet del IRD, por su dedicación, entusiasmo en el desarrollo del proyecto metilmercurio, así como también por las enseñanzas y experiencias compartidas en el trabajo de campo.

Al proyecto metilmercurio auspiciado por la Organización de Estados Americanos (OEA) y al proyecto Jeune Equipe – SRB del Instituto de Investigación para el desarrollo (IRD) por haberme permitido ser participe de estos proyectos.

Así también, extendiendo mis agradecimientos a los PhD. Jasmin Hurtado (Peru), PhD. Jean Louis Douprey (Francia-IRD), PhD. Jean Remy Guimaraes (Brasil- IRD), quienes fueron parte del tribunal evaluador externo, por sus observaciones y sugerencias al presente trabajo, y sin duda por su aporte en el campo científico.

No puedo dejar de mencionar y agradecer profundamente la colaboración prestada por los PhD. William B. Whitman y Magdalena Sieprawska-Lupa (Georgia University, Departamento de Microbiología, USA) y Hinsby Cadillo Quiroz (Cornell University, Departamento de Microbiología, USA), PhD. Richard Devereux (EPA-Pensacola, USA) quienes aportaron significativamente al desarrollo del presente trabajo,.

Al Laboratorio de Control de Calidad (LCA), en especial a su responsable Ing. Jaime Chincheros y a todo el personal que trabaja en el mismo, por su apoyo y guía constante en el análisis fisicoquímico de las muestras.

A la Universidad Mayor de San Andres, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas, Facultad de Biología, a todo su personal académico y administrativo. En especial a todos los docentes, amigos y compañeros de la maestría.

Un sincero agradecimiento a mi compañera de trabajo en el desarrollo de esta tesis, Daniela Arteaga Voight, quien supo entenderme y aconsejarme, en especial por toda su fuerza, entusiasmo y apoyo. Del mismo modo, a Ruddy, Vanesa, Sonia, Oscar, Sissy, Carla, Ximena, Samanta, Eliana y a todas las personas que me brindaron su amistad junto a una sincera voz de aliento.

A toda mi familia, Abuelos, tios, primos y en especial a mi padre Valerio Salazar P. y mi madre Julia Chavez C., quienes me dieron fortaleza y sabios consejos, a mi hermano Gary por su apoyo en todo momento.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICOS	9
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE ANEXOS	11
RESUMEN	12
1 .INTRODUCCIÓN	13
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	15
2.1. ECOLOGÍA MICROBIANA DE SEDIMENTOS	15
2.1.1. SEDIMENTOS	15
2.1.2. COMUNIDADES MICROBIANAS EN SEDIMENTOS	17
2.2. RELACIÓN ENTRE COMUNIDADES DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS Y ARQUEAS METANÓGENAS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	19
2.2.1. BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS	23
2.2.1.1. DIVERSIDAD ECOLÓGICA	24
2.2.1.2. DIVERSIDAD METABÓLICA	25
2.2.1.3. TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA	28
a. <i>Desulfotomaculum (DFM) – Subgrupo (1)</i>	29
b. <i>Desulfobulbus (DBB) – Subgrupo (2)</i>	31
c. <i>Desulfobacterium (DBM) – subgrupo (3)</i>	31
d. <i>Desulfobacter (DSB) – Subgrupo (4)</i>	32
e. <i>Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina (DCC) – Subgrupo (5)</i>	32
f. <i>Desulfovibrio-Desulfomicrobium – subgrupo (6)</i>	33
2.2.2. ARQUEAS METANÓGENAS	34
2.2.2.1. DIVERSIDAD ECOLÓGICA	36
2.2.2.2. DIVERSIDAD METABÓLICA	37
2.2.2.3. TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA	37
a. <i>Orden Methanobacteriales</i>	38
b. <i>Orden Methanococcales</i>	39
c. <i>Orden Methanomicrobiales</i>	39
d. <i>Orden Methanosarcinales</i>	39
e. <i>Orden Methanopyrales</i>	39
2.3. ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES	40
2.3.1. DIVERSIDAD MICROBIANA BASADA EN EL 16S rRNA	42
2.3.2. EXTRACCIÓN DEL 16S rRNA DE SEDIMENTOS	42
2.3.3. HIBRIDIZACIÓN MOLECULAR CUANTITATIVA	43
2.3.4. ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SRB Y MA MEDIANTE HIBRIDIZACIÓN MOLECULAR	44
2.3.4.1. <i>Limitaciones y problemas del ensayo de hibridización en estudios de la ecología microbiana</i>	46
2.4. ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN LA AMAZONIA BOLIVIANA	47

<b>3. OBJETIVOS:</b>	<b>50</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL:	50
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	50
<b>4. HIPÓTESIS:</b>	<b>50</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>51</b>
5.1. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DE ESTUDIO	51
5.2. COLECTA DE LAS MUESTRAS	53
5.3. ANÁLISIS FISCOQUÍMICO Y GEOQUÍMICO	53
5.3.1. <i>Porcentaje de agua y densidad</i>	53
5.3.2. <i>Medición de pH y Eh</i>	53
5.3.3. <i>Análisis de carbono y nitrógeno orgánico</i>	54
5.3.4. <i>Concentración y porcentaje de saturación de oxígeno en la columna de agua</i>	54
5.4. ANÁLISIS MOLECULAR	54
5.4.1. <i>Extracción del 16S rRNA a partir de sedimentos</i>	54
5.4.2. HIBRIDIZACIÓN MOLECULAR CUANTITATIVA - DOT-BLOT	55
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
5.5.1. <i>Validación de las membranas de hibridación</i>	57
5.5.2. <i>Análisis cuantitativo</i>	57
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PERFILES SEDIMENTARIOS	60
6.2. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y GEOQUÍMICAS DE LOS PERFILES SEDIMENTARIOS	61
6.2.1. <i>Porcentaje de agua y densidad</i>	61
6.2.2. <i>pH y potencial oxido-reductor</i>	62
6.2.3. <i>Porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno</i>	64
6.2.3.1. <i>Razón C/N</i>	68
6.2.4. <i>Concentración y porcentaje de saturación de oxígeno en la columna de agua</i>	68
6.3. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MUESTRAS SEDIMENTARIAS	69
6.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL MEDIANTE HIBRIDIZACIÓN MOLECULAR.	71
6.4.1. <i>Perfil vertical de la composición de dominios</i>	71
6.4.2. <i>Distribución y abundancia de las comunidades microbianas de SRB y MA</i>	74
6.4.3. <i>Estructura cuantitativa de las comunidades microbianas de SRB y MA entre lagunas</i>	78
6.5. DISTRIBUCIÓN DE SRB Y MA Y ASOCIACIÓN CON FACTORES FISCOQUÍMICOS Y GEOQUÍMICOS	79
<b>7. DISCUSIONES</b>	<b>81</b>
7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PERFILES SEDIMENTARIOS	81
7.2. ASOCIACIÓN ENTRE LA COMUNIDAD DE SRB Y MA Y PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y GEOQUÍMICAS DE LOS PERFILES SEDIMENTARIOS	82
7.2.1. <i>Porcentaje de agua y densidad</i>	82
7.2.2. <i>pH y potencial oxido-reductor</i>	84
7.2.3. <i>Porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno</i>	86
7.3. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MUESTRAS SEDIMENTARIAS Y CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS PARA LA HIBRIDIZACIÓN CUANTITATIVA EN MEMBRANA	90
7.4. ESPECIFICIDAD DE LAS SONDAS	92
7.5. PERFIL VERTICAL DE LA COMPOSICIÓN Y ABUNDANCIA DE DOMINIOS	93
7.6. DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA DE COMUNIDAD DE SRB Y MA EN SEDIMENTOS DE LAGUNAS DE AGUAS BLANCAS Y AGUAS NEGRAS	95
7.6.1. <i>Comunidad de SRB</i>	97

a.	Desulfotomaculum (DFM) – Subgrupo (1)	98
b.	Desulfobulbus (DBB) – Subgrupo (2)	99
c.	Desulfobacter (DSB) – Subgrupo (4)	101
d.	Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina (DCC) – Subgrupo (5)	102
e.	Desulfovibrio-Desulfomicrobium – subgrupo (6)	103
7.6.2.	<i>Distribución y abundancia de la comunidad de MA</i>	104
a.	Orden Methanococcales (MC)	104
b.	Orden methanomicrobiales (MG)	105
c.	Orden Methanosarcinales (MSMX)	105
7.7.	INTERACCIÓN Y ECOLOGÍA DE LAS COMUNIDADES DE SRB Y MA	106
8.	CONCLUSIONES	110
9.	RECOMENDACIONES	113
10.	REFERENCIAS	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. TIPOS DE SEDIMENTO DE ACUERDO A SU COMPOSICIÓN. _____	16
FIGURA 2. RELACIONES METABÓLICAS ENTRE COMUNIDADES DE SRB Y MA. _____	20
FIGURA 3. MICROFOTOGRAFÍA DE <i>DESULFOVIBRIO DESULFURICANS</i> . _____	24
FIGURA 4. ÁRBOL FILOGENÉTICO BASADO EN EL 16S RRNA DONDE SE MUESTRAN LOS SEIS LINAJES DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (DALY <i>ET AL.</i> , 2000). _____	30
FIGURA 5. MICROFOTOGRAFÍA DE <i>METHANOSARCINA MAZEI</i> . _____	36
FIGURA 6. ÁRBOL FILOGENÉTICO BASADO EN EL 16S RRNA DONDE SE MUESTRAN LOS CINCO ÓRDENES DE ARQUEAS METANOGÉNICAS (GARCÍA <i>ET AL.</i> , 2000). _____	38
FIGURA 7. ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL 16S RRNA PARA <i>E. COLI</i> , BASADA EN ANÁLISIS DE SECUENCIA. _____	42
FIGURA 8. ESQUEMA DE LA HIBRIDACIÓN MOLECULAR DOT BLOT. _____	43
FIGURA 9. MAPA DEL RÍO BENI Y DE LAS LAGUNAS ESTUDIADAS EN LA REGIÓN DE RURRENABAQUE	52
FIGURA 10: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (1.2%) DE EXTRACTOS DEL 16S RRNA, OBTENIDOS MEDIANTE EL MÉTODO FLEMING-CTAB. A) CHITIWARA PUNTO CEN, B) CHITIWARA PUNTO DEM, C) SAN GREGORIO PUNTO CEN Y D) SAN GREGORIO PUNTO DEM.	70

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICA 1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y GEOQUÍMICAS DE LOS PERFILES SEDIMENTARIOS DE LA GRANJA Y RÍO VIEJO _____	66
GRÁFICA 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y GEOQUÍMICAS DE LOS PERFILES SEDIMENTARIOS DE CHITIWARA Y SAN GREGORIO _____	67
GRÁFICA 3. ESTRUCTURA VERTICAL DE ABUNDANCIA RELATIVA DE BACTERIA, ARQUEA Y EUCARIA_	73
GRÁFICA 4. ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS SUB-GRUPOS DE SRB. _____	76
GRÁFICA 5. ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS GRUPOS DE MA _____	77
GRÁFICA 6. COMPARACIÓN DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS SUB-GRUPOS DE SRB Y MA _____	80

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES EN LA CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (CASTRO <i>ET AL.</i> , 2000)	29
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS LAGUNAS EN ESTUDIO EN LA REGIÓN DE RURRENABAQUE	52
TABLA 3. PARÁMETROS DE LAS SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS	56
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ESTRATOS SEDIMENTARIOS COLECTADOS DE LAS LAGUNAS EN ESTUDIO	61
TABLA 5. RAZÓN C/N EN LAS CUATRO LAGUNAS ESTUDIADAS	68
TABLA 6. CONCENTRACIÓN DE OXIGENO DISUELTO (MG/L) Y PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE O <sub>2</sub>	68
TABLA 7. ÍNDICE DE CORRELACIÓN ENTRE LA COMUNIDAD DE SRB Y MA Y LOS FACTORES FÍSICOQUÍMICOS Y GEOQUÍMICOS EN CADA LAGUNA EN ESTUDIO	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. VALORES PROMEDIO DE FACTORES FISICOQUÍMICOS Y GEOQUÍMICOS E INDICE DE CORRELACIÓN ENTRE LOS SITIOS CEN Y DEM EN LAS LAGUNAS EN ESTUDIO _____	142
ANEXO 2. INDICE DE CORRELACIÓN DEL %C Y %N ENTRE LAGUNAS DE AGUAS BLANCAS Y NEGRAS.	143
ANEXO 3. ABUNDANCIA RELATIVA TOTAL DE SRB Y MA _____	143
ANEXO 4. INDICE DE CORRELACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE SRB Y MA _____	144
ANEXO 5. INDICE DE CORRELACIÓN ENTRE SITIOS DE MUESTREO _____	144
ANEXO 6. INDICE DE CORRELACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE SRB Y MA Y LOS FACTORES FISICOQUÍMICOS Y GEOQUÍMICOS EN LAS LAGUNAS _____	145
ANEXO 7. DOMINANCIA DE LOS GRUPOS DE SRB Y MA EN RELACIÓN A LA SEÑAL DE UNI AJUSTADA	146

## RESUMEN

La cuenca amazónica por su riqueza en materia orgánica y por las concentraciones acumuladas de mercurio representa una zona de interés para el estudio de la diversidad microbiana de comunidades de bacterias sulfato reductoras (SRB) y arqueas metanogénicas (MA) que se encuentran asociadas a los procesos de mineralización de la materia orgánica y la especiación del mercurio, particularmente en los sedimentos de ecosistemas dulceacuícolas, como los sedimentos de las lagunas meandricas del río Beni.

A través del análisis por hibridación molecular no radiactiva (dot blot) en extractos de 16S rRNA se determino la distribución y abundancia de los dominios arquea, eucaria y bacteria mostrando a arquea como el dominios más abundante seguido de eucaria y bacteria, así como de cinco grupos de bacterias sulfato reductoras (*Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*) y dos órdenes (Methanosarcinales y Methanomicrobiales) y una familia (Methanococcaceae) de arqueas metanogénicas en los primeros 10 cm del perfil sedimentario de lagunas meandricas de aguas blancas y aguas negras del río Beni en la amazonía Boliviana.

La abundancia y distribución de los grupos microbianos de SRB y MA fueron correlacionadas con los factores fisicoquímicos y geoquímicos propias de cada laguna (lagunas de aguas blancas y negras). Observándose mayor abundancia en SRB y MA en las lagunas de aguas negras que presentan mayor contenido de carbono y nitrógeno que las lagunas de aguas blancas. Siendo *Desulfotomaculum* y Methanosarcinales los mas predominantes en las lagunas de aguas blancas y *Desulfobulbus* y Methanomicrobiales en las lagunas de aguas negras. Por otra parte, condiciones reductoras (-129mV a -105mV) y oxidantes o levemente reductoras (68mV a -73mV) están asociadas con la abundancia de *Desulfotomaculum* y *Desulfobulbus*, respectivamente. Así mismo, el sitio de muestreo CEN (sin vegetación) muestra menor abundancia de SRB y MA en relación al sitio DEM (con vegetación).

Se observa también una correlación entre la abundancia de *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y Methanosarcinales en las lagunas de aguas blancas, así como entre *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y Methanomicrobiales en las lagunas de aguas negras lo que sugiere posibles relaciones sintróficas. Los resultados obtenidos en este estudio servirán de base para futuros estudios sobre la diversidad y ecología de comunidades microbianas, así como para el análisis de los procesos de metilación y demetilación del mercurio que involucran a comunidades microbianas como las SRB y MA, respectivamente.

**Palabras clave:** Bacterias sulfato reductoras, arqueas metanogénicas, 16S rRNA, sedimento, factores fisicoquímicos, factores geoquímicos, hibridación molecular

## 1 .INTRODUCCIÓN

La región amazónica del Beni contiene un gran número de hábitats y nichos ecológicos que se encuentran fuertemente influenciados por las épocas de inundación periódicas de crecidas y de bajura de ríos (Ibisch *et al.*, 2003; Pouilly *et al.*, 2004). En la cuenca amazónica del río Beni, estos períodos de inundación han dado origen a meandros lagunares, algunos de los cuales, con el transcurso del tiempo, se han establecido como lagunas de tierra firme, encontrándose distanciadas de la influencia de los caudales y procesos de sedimentación del río. Así, cada uno de estos ecosistemas presenta diversidad de condiciones fisicoquímicas, geoquímicas y geológicas, como lo son por ejemplo las lagunas de aguas blancas y lagunas de aguas negras, las mismas que se diferencian principalmente por su contenido de carbono y nitrógeno. La región amazónica se caracteriza por suelos ricos en materia orgánica y biodiversidad microbiana que aún continua sin ser explorada, razón por la cual se constituye en un área de interés para el estudio de la biodiversidad y ecología de las comunidades microbianas.

Además, los suelos amazónicos representan la fuente principal y reservorio de mercurio para los sistemas acuáticos (Malm *et al.*, 1990; Nriagu *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1993; Bourgoin *et al.*, 1999), el cual bajo condiciones favorables puede ser transformado a metilmercurio (potente neurotóxico) en los sedimentos y/o plantas acuáticas (Guimaraes *et al.*, 2000; Roulet *et al.*, 2001) incorporándose en la cadena trófica acuática. Las bacterias sulfato reductoras han sido señaladas como los principales contribuidores biológicos de la metilación del mercurio en sedimentos (Anderson *et al.*, 1995; King *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000; Blum y Bartha, 1980; Devereux *et al.*, 1996; Gilmour y Henry, 1991; Gilmour *et al.*, 1992; Gilmour *et al.*, 1998), debido a la existencia de una la relación cinética entre la sulfato reducción y la metilación del mercurio, proporcionando evidencias de la existencia de un “acoplamiento” entre estos procesos (King *et al.*, 1999). Por otra parte, las arqueas metanógenas (MA) juegan un rol crítico en procesos biogeoquímicos importantes tales como la demetilación oxidativa del metilmercurio (Oremland *et al.*, 1991). De tal forma que tanto las SRB y MA están involucradas en los procesos de transformación y especiación del mercurio y sus derivados, por lo que su estudio en la amazonía es de vital importancia por la problemática del mercurio en esta región.

Además, ambas comunidades están asociadas a los procesos de mineralización de la materia orgánica. Se ha observado que en sedimentos marinos, la sulfato reducción es el proceso dominante mientras que la metanogénesis solo ocurre vía compuestos primarios (metilaminas) que las SRB son incapaces de utilizar (Winfrey *et al.*, 1983; Purdy *et al.*, 2003). Mientras que en sedimentos de aguas dulces, la sulfato reducción ocurre pobremente debido a la limitada disponibilidad de sulfato, por lo que la metanogénesis es el proceso dominante (Lovley *et al.*, 1992; Fukui *et al.*, 1999). Además, ambas comunidades microbianas interactúan en un proceso conocido como SINTROFÍA (mutualismo simbiótico), en la que dos o más especies proveen una red de beneficios para otra (Patidar & Tare, 2005; Chauchan *et al.*, 2006; Woyke *et al.*, 2006; Stolyar *et al.*, 2007), estableciendo relaciones de coexistencia y competencia por sustratos comunes tales como acetato o hidrógeno en función a las características del ecosistema donde habitan (Devereux *et al.*, 1996; Raskin *et al.*, 1996; Zepp-Falz *et al.*, 1999; Alm *et al.*, 2000; Go *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2003a; Purdy *et al.*, 2003; Glissmann *et al.*, 2004; Patidar & Tare, 2005; Chauchan *et al.*, 2006; Briée *et al.*, 2007).

En los años recientes, el uso de técnicas independientes de cultivo y principalmente el uso del 16S rRNA como marcador filogenético, ha incrementado considerablemente la información disponible acerca de la composición de comunidades microbianas en diversos ecosistemas, hábitats y microhábitats dulceacuícolas, permitiendo la identificación de diversos grupos y a la mejor comprensión de su función ecológica (Briée *et al.*, 2007). Sin embargo, el conocimiento de esta composición es todavía insuficiente, dada la heterogeneidad de los hábitat en espacio y tiempo y al hecho de que varios factores ecológicos, fisicoquímicos (potencial óxido-reductor, pH, niveles de oxígeno) y biológicos (materia orgánica, productores primarios o depredación entre otros) influyen a varios niveles en la composición de las comunidades microbianas (Briée *et al.*, 2007).

Por tanto, el presente trabajo, desarrollado en el marco del proyecto “Metilmercurio – OEA” del Institut de Recherche pour le Développement (IRD) y del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (IBMB) de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), pretende estudiar la distribución y abundancia poblacional de cinco grupos de bacterias sulfato reductoras (*Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*), dos órdenes (Methanosarcinales y Methanomicrobiales) y una familia (Methanococcaceae) de

arqueas metanogénicas a través del análisis por hibridización molecular no radiactiva (dot-blot) en extractos del 16S rRNA proveniente de muestras sedimentarias con diferentes características fisicoquímicas y geoquímicas de dos tipos de lagunas (aguas blancas y aguas negras) de la cuenca amazónica del Río Beni.

Este estudio servirá de base para futuros estudios sobre la diversidad y ecología de comunidades microbianas, así como para el análisis de los procesos de metilación y demetilación del mercurio que involucran a comunidades microbianas como las SRB y MA, respectivamente.

## **2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **2.1. ECOLOGÍA MICROBIANA DE SEDIMENTOS**

La ecología microbiana estudia la relación entre los microorganismos y su medio ambiente físico y biológico, mediante la determinación de factores que regulan la diversidad y distribución de las comunidades microbianas a través de la escala espacio-temporal (Briée *et al.*, 2007). Los ecosistemas acuáticos, particularmente de aguas dulces (ríos y arroyos, lagos y charcos, tierras húmedas y agua subterráneas) están representativamente sustentados por microorganismos, que numéricamente y bioquímicamente dominan todos los hábitats. Muchos de estos microorganismos son considerados como principales componentes de ciclos biogeoquímicos de elementos tales como el carbono y nitrógeno, y por lo tanto, juegan un rol significativo en la biosfera. Sin embargo, el estudio de la diversidad microbiana en estos ecosistemas se hace dificultoso debido a la heterogeneidad del hábitat en espacio y tiempo y a varios factores ecológicos, tanto físicos como biológicos, que influyen en diferentes magnitudes sobre la composición de las comunidades microbianas (Lindstrom *et al.*, 2005; Hahn, 2006; Briée *et al.*, 2007).

#### **2.1.1. Sedimentos**

El término “sedimento” es ampliamente definido para incluir a todo el material no consolidado que constituye el fondo del ecosistema acuático, incluyendo el fino cieno, la arena, las piedrillas sueltas y la parcial o total materia orgánica enterrada o depositada sobre ella que se encuentra conectado a la zona hiporreica (sedimentos saturados bajos y lateralmente

adyacente a los cuerpos de aguas donde hay actividad de cambio entre el agua subterránea y agua superficial) (Figura 1). La zona en la que el sedimento se encuentra saturado de agua, encontrándose con la columna de agua se conoce como “interfase agua-sedimento”, cuya cohesión y estabilidad dependen de condiciones físicas, químicas y biológicas (Lundkvist *et al.*, 2007). En ecosistemas acuáticos tales como lagos, esta interfase puede ser obvia, mientras la distinción entre el sedimento y la columna de agua es menos clara y más variable con el tiempo en arroyos y ríos con alta energía.



**Figura 1111. Tipos de sedimento de acuerdo a su composición.**

Eliminado: 1

Durante el proceso de sedimentación, los productos son transportados y se acumulan gracias a la acción de la gravedad, sufriendo alteraciones químicas como corrosión, oxidación o disolución y generalmente se acumulan en áreas casi siempre cóncavas, denominadas cuencas de sedimentación, lugar donde se depositan sobre las que lo

hicieron anteriormente. Como consecuencia, se produce un aumento de la presión que a su vez resulta en una serie de fenómenos que modifican sus características. Es decir que la sedimentación constituye la interacción entre la deposición de la materia orgánica de la capa superior de la columna de agua y los procesos de descomposición que conducen a la formación de capas sedimentarias, las cuales difieren en el contenido orgánico (Ambrosetti *et al.*, 2003). La complejidad de estos ambientes frecuentemente se incrementa por la mezcla de sedimentos por las corrientes o por la actividad de invertebrados (Spring *et al.*, 2000), viéndose también afectados los procesos de sedimentación por la vegetación (Hannon & Gaillard, 1997; Brieé *et al.*, 2007), así como por los ríos, que juegan un rol importante en la entrada de materia carbonada y orgánica al lago, llevando al rápido consumo de oxígeno y a las condiciones anóxicas casi permanentes (Haberman *et al.*, 2004; Brieé *et al.*, 2007). La estabilidad del sedimento también está condicionada por factores físicos como el contenido de agua y las propiedades mineralógicas de las partículas sedimentarias (presencia de arcilla, carbonados, silicatos, óxidos de metales, etc), las cuales influyen en los procesos de

deposición y consolidación antes mencionados, creando diferencias en la estabilidad tanto vertical como horizontalmente, afectando al metabolismo microbiano e impactando en la ecología microbiana, tanto en estructura como en funcionalidad (Lundkvist *et al.*, 2007). En suma, el principal factor químico que influencia los procesos de sedimentación es el que dirige la naturaleza de la atracción electrostática, causada por el apareamiento de iones, ya que afecta los procesos de floculación entre partículas sedimentarias. Finalmente, se ha establecido que la interacción entre los factores fisicoquímicos y biológicos da lugar a la estabilización sedimentaria (Lundkvist *et al.*, 2007).

### **2.1.2. Comunidades microbianas en sedimentos**

Uno de los principales objetivos de la ecología microbiana es caracterizar microorganismos que juegan un rol importante en las transformaciones de la biosfera y de este modo establecen cambios sobre su diversidad. Los procariontes (bacterias y arqueas) son parte importante de la microflora en la mayoría de los ecosistemas y en particular en los sedimentos acuáticos debido a su abundancia, diversidad de especies y multiplicidad de actividades metabólicas (Miskin *et al.*, 1998; Haglund *et al.*, 2003; Sestanovic *et al.*, 2005). La biomasa y actividad microbiana son generalmente altas cerca de la superficie del sedimento, decreciendo con la profundidad. Considerando la alta abundancia de microorganismos en sedimentos, la actividad microbiana dentro es a menudo baja, lo que indica que la actividad célula específica es baja o que una pequeña fracción de esta comunidad microbiana es metabólicamente activa (Haglund *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2007).

Los microorganismos que habitan el sedimento juegan un rol importante en la descomposición de la materia orgánica y en los ciclos biogeoquímicos de elementos principales (carbono, nitrógeno, fósforo, etc.), elementos trazas (hierro, níquel, mercurio, etc.) y están, por lo tanto, altamente implicados en los cambios de energía y nutrientes dentro de los sedimentos (Miskin *et al.*, 1998; Ranjard *et al.*, 2000; Urakawa *et al.*, 2000; Schultz & Urban, 2007; Schwarz *et al.*, 2007). Los procesos biológicos que median la descomposición de la materia orgánica en sedimentos ocurren en función a las necesidades metabólicas de los microorganismos que las habitan, siendo las tasas de descomposición dependientes de la abundancia bacteriana (Fernandes *et al.*, 2007; Schultz & Urban, 2007). En suma, la

descomposición del fitoplancton incrementa la biomasa bacteriana lo que coincide con las altas actividades metabólicas y con la pérdida significativa de materia orgánica particulada, estando la materia orgánica particulada del sedimento correlacionada con la abundancia microbiana y con la calidad nutricional de la materia orgánica degradable (Fernades *et al.*, 2007; Schultz & Urban, 2007).

La localización geográfica y morfológica, la composición química del agua y sedimento es también importante en la determinación del complejo biótico habitante de los ecosistemas acuáticos. Del mismo modo, factores abióticos, tales como el tipo de sedimento, estatus de nutrientes, sustancias contaminantes, temperatura, luz, gradiente de oxígeno y otras variables ambientales influyen en la estructuración de la comunidad bacteriana, la cual a su vez se adapta y modifica a su ambiente. (Edwards *et al.*, 2001; Horner-Devine *et al.*, 2004; Haberman *et al.*, 2004; Bühring *et al.*, 2005). Por lo tanto, la complejidad de las condiciones ambientales puede variar por escala espacial y temporal, pudiendo influir potencialmente sobre la diversidad microbiana. Esta diversidad da lugar a que existan interacciones entre especies, interacciones entre microorganismos, dando pie a que microorganismos de características específicas puedan ocupar nichos ecológicos que de otra manera no lograrían (Stolyar *et al.*, 2007).

La mayoría de los sedimentos de aguas dulces son ecosistemas bastante heterogéneos que se reflejan en la biodiversidad de nichos ambientales incluso en la escala de milímetros (Spring *et al.*, 2000). La heterogeneidad a microescala (escala de las partículas sedimentarias) puede ser muy elevada y potencialmente permitir una elevada diversidad microbiana en un área relativamente pequeña (Sestanovic *et al.*, 2005). Por ejemplo, dentro de una simple partícula sedimentaria, la concentración de oxígeno puede variar fuertemente en unos pocos milímetros (Horner-Devine *et al.*, 2004). Una consecuencia de esta heterogeneidad es que las condiciones de crecimiento no son uniformes para diferentes grupos microbianos y los factores bióticos y abióticos pueden promover sucesivos cambios en la composición de la comunidad y viceversa (Riemann *et al.*, 2000; Sestanovic *et al.*, 2005).

En los sedimentos acuáticos, tanto bacterias como arqueas resultan ser eficientes aprovechadores de las fuentes de energía (combustible) y de los aceptores de electrones

(oxidantes) presentes. Además compiten ampliamente con los eucariotas que son metabólicamente menos eficientes (Balows *et al.*, 1991) debido a que se encuentran limitados en cuanto a la fuentes de energía, misma que es convertida en glucosa o productos como el piruvato, además el oxígeno constituye el único aceptor de electrones utilizado para la metabolización de su fuente de energía. Al contrario, la diversidad de los procariotas se expresa en términos de metabolismo en lugar de estructura, por lo que lograron optimizar sus rutas metabólicas para la captación y utilización de una amplia variedad de nutrientes y donadores de electrones, tanto orgánicos como inorgánicos, así como de aceptores alternativos de electrones o “substitutos del oxígeno” para la respiración en ausencia del oxígeno molecular lo cual los convierte en extremadamente versátiles, mientras otros son especialistas con remarcable eficiencia en sus propios nichos y es común encontrar a estos especialistas microbianos en intrincados metabolismos simbióticos con otros especialistas (Schink, 1991), por lo que diferentes interacciones ocurren entre diferentes tipos fisiológicos de microorganismos (Spring *et al.*, 2000). Como resultado, los sedimentos son sitios específicos para procesos metabólicos tales como la oxidación de la materia orgánica, la transformación microbiana de compuestos y el funcionamiento de ciclos biogeoquímicos, encontrándose afectados por ellos (Hollibaugh *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2007), principalmente para grupos funcionales particulares tales como las bacterias nitrificantes, denitrificantes, sulfato reductoras, metanógenas y metanotróficas.

## **2.2. RELACIÓN ENTRE COMUNIDADES DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS Y ARQUEAS METANÓGENAS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

La metanogénesis está asociada con la descomposición de la materia orgánica en ausencia o agotamiento de otros aceptores de electrones tales como el oxígeno, nitrógeno y hierro (III) (Chauchan *et al.*, 2006). La actividad coordinada de diversos grupos microbianos incluyendo a los fermentadores, sintrófos (como las bacterias sulfato reductoras) y metanógenos se requieren para la conversión efectiva de la materia orgánica a metano (CH<sub>4</sub>) (Figura 2). La oxidación de los productos de fermentación primaria tales como el propionato, butirato y algunos alcoholes requiere la cooperación de organismos oxidantes de los ácidos grasos, tales como las bacterias sulfato reductoras (sintrófos) y microorganismos consumidores de hidrógeno, tales como las metanógenas hidrogenotróficas, dando lugar a una forma de interacción interespecies conocida como SINTROFÍA (mutualismo simbiótico), en la que dos

o más especies proveen una red de beneficios para otra (Rudd *et al.*, 1978; Patidar & Tare, 2005; Chauchan *et al.*, 2006; Woyke *et al.*, 2006; Thauer & Shima, 2006; Stolyar *et al.*, 2007). Así, estos procesos dan origen a relaciones de coexistencia y competencia entre arqueas metanogénicas y bacterias sulfato reductoras, generándose la competencia por sustratos comunes tales como acetato o el hidrógeno en función a las características del ecosistema donde habitan (Zepp-Falz *et al.*, 1999; Alm *et al.*, 2000; Go *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2003<sup>a</sup>; Glissmann *et al.*, 2004; Patidar & Tare, 2005; Chauchan *et al.*, 2006). Los sedimentos de lagos son permanentemente anóxicos debajo de la superficie a 1 ó 2 centímetros y se caracterizan por gradientes de sustratos y aceptores de electrones, generando las condiciones adecuadas para que la metanogénesis y la sulfato reducción sean los procesos más importantes en la mineralización de componentes orgánicos (Schwarz *et al.*, 2007).

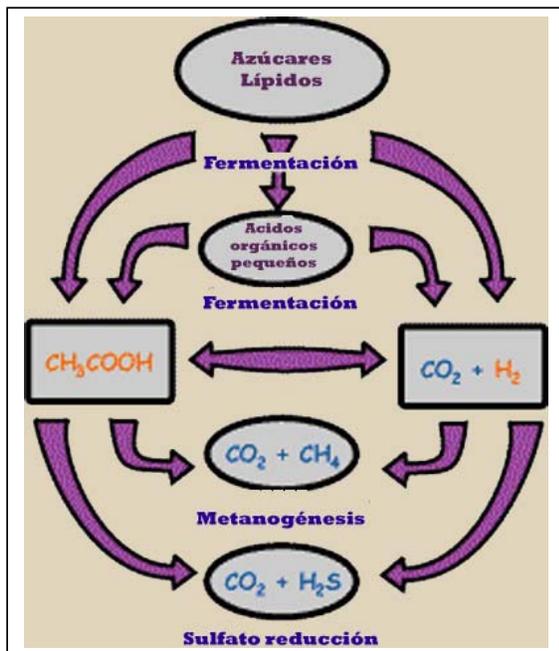


Figura 2222. Relaciones metabólicas entre comunidades de SRB y MA.

Eliminado: 2

En sedimentos marinos, la sulfato reducción es el proceso dominante mientras que la metanogénesis solo ocurre vía compuestos primarios de C1, tal como las metilaminas, misma que las SRB son incapaces de utilizar (Winfrey *et al.*, 1983; Purdy *et al.*, 2003). Mientras que en sedimentos de aguas dulces la sulfato reducción ocurre pobremente debido a la limitada disponibilidad de sulfato, por lo que la metanogénesis es el proceso dominante (Lovley *et al.*, 1992; Fukui *et al.*, 1999). La

metanogénesis es llevada a cabo por arqueas productoras de metano metabólicamente diferentes las cuales están exclusivamente relacionadas con el dominio arquea. La sulfato reducción acontece por encima del 50% de la degradación de la materia orgánica en

sedimentos marinos y similares proporciones han sido reportadas para la metanogénesis en sistemas sedimentarios de aguas dulces (Jørgensen, 1982; Lovley *et al.*, 1992). Sin embargo, la dinámica de la sulfato reducción y la metanogénesis en los sedimentos esta sustentada sobre la medición de procesos y la inferencia de estudios con cepas cultivables, por lo tanto, poco se conoce acerca de la identidad de los principales roles en el ambiente o los factores ambientales que afectan su actividad y distribución.

Por otra parte, se piensa que las SRB compiten mejor sobre las metanógenas en presencia de concentraciones elevadas de sulfato porque son mejores competidores para sustratos comunes (hidrógeno y acetato) debido a la cinética y ventaja termodinámica (Ward y Winfrey, 1985; Widdel, 1988). Este clásico paradigma del predominio de las SRB y MA en ambientes con elevada y baja concentración de sulfato, respectivamente, se ha observado a través de la acumulación de resultados de numerosos estudios desde mediados de los 70s (Smith, 1993; Ward y Winfrey, 1985; Widdel, 1988). Recientemente, la coexistencia de SRB y MA ha sido observada en presencia de concentraciones no limitantes de sulfato (Amann y Schleifer, 1995; Isa y Verstraete, 1986; Nanninga y Gottschal, 1986; Nielsen, 1987; Parkin *et al.*, 1990; Yoda *et al.*, 1987). Estas observaciones se atribuyen a diferencias en la colonización microbiana y propiedades de adhesión (Isa y Verstraete, 1986; Yoda *et al.*, 1987) o tóxicos variables de sulfuro (Hilton y Oleszkiewicz, 1988; Parkin *et al.*, 1990). Además, estudios recientes encontraron poblaciones significantes de SRB en ambientes con niveles bajos en sulfato (Mancuso *et al.*, 1990; Thiele *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1992). Estas observaciones explican porque las SRB pueden crecer sintróficamente con metanógenas consumidoras de hidrógeno o formando co-cultivos definidos de lactato, etanol, propionato, fumarato y piruvato, eliminando su necesidad de reducir sulfato (Arche y Powell, 1985; Bryant *et al.*, 1977; Guyot, 1986; Jones *et al.*, 1983; Tasaki *et al.*, 1993; Traore *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1992)

Así mismo, estudios en sedimentos revelaron elevadas proporciones de sulfato reductores y metanógenas dentro de la zona de transición sulfato-metano lo que sugiere que la oxidación anaerobia del metano esta acoplada a la sulfato reducción (Iversen y Jørgensen, 1985; Thomsen *et al.*, 2001; D'Hondt *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2005). La reducción deasimilatoria del sulfato pueden estar relacionado con la oxidación de sustratos que son difíciles de degradar bajo condiciones anóxicas, tales como los alcanos y compuestos aromáticos, o aun

la oxidación anaerobia de metano en la zona de transición sulfato - metano (Iversen y Jorgense, 1985; Thomsen *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2004). Por lo tanto, desde que las bacterias sulfato reductoras y metanógenas en sedimentos puede competir por la misma fuente de carbono y donadores de electrones (Oremland *et al.*, 1978), la inhibición de las sulfato reductoras puede conducir el flujo de electrones a poblaciones metanógenas.

Señalando ejemplos mas específicos de esta relación sintrófica entre estos dos grupos microbianos, podemos señalar por ejemplo que *Desulfotomaculum* se halla conjuntamente a MA en diversos ambientes continentales polucionados (Kenglen *et al.*, 1999), e interaccionan con las arqueas en la degradación de tolueno, aunque son capaces de vivir con etanol, propionato, butirato, lactato y especialmente con compuestos aromáticos como el benzoato (Ficker *et al.*, 1999). Por otra parte, la oxidación completa realizada por *Desulfococcus*, *Desulfonema* y *Desulfosarcina* puede tener relación con la actividad sintrófica entre las metanógenas, de manera semejante a *Desulfobacterium*, especialmente en sedimentos marinos a mas de un metro de profundidad (Thomsen *et al.*, 2001), Además, Wilms *et al.*, (2006) observaron que la sulfato reducción y la metanogénesis son los principales procesos de oxidación terminal en las capas de sedimentos marinos anóxicos. La oxidación del metano en anaerobiosis parece estar relacionada a la utilización del hidrógeno formado, principalmente por bacterias sulfato reductoras de estos tres géneros (*Desulfococcus*, *Desulfonema* y *Desulfosarcina*) (Orphan *et al.*, 2001). Asimismo, las SRB también pueden utilizar hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>), como *Desulfovibrio vulgaris* NCIB 8303 y acoplar esta parte de su metabolismo a una relación simbiótica con poblaciones de arqueas metanógenas. Por lo que al examinar la relación entre la cinética sulfato e hidrógeno se encontraron cepas nuevas de SRB capaces de llevar a cabo este proceso (Sonne-Hansen *et al.*, 1999). Del mismo modo, se descubrió genes de *Desulfovibrio spp* relacionado con la respiración de sulfato durante el metabolismo de hidrógeno y lactato (Steger *et al.*, 2002).

Por otra parte, investigaciones anteriores sobre la metilación del mercurio revelaron que los sedimentos anaerobios substancialmente producen grandes cantidades de metilmercurio comparado con sedimento aerobios (Jensen y Jernelov, 1969; Olson y Cooper, 1976). Estudios de inhibición utilizando bromoetanosulfonato, un inhibidor específico de la metanogénesis, excluye a las bacterias metanogénicas como los primeros metiladores porque la producción de metilmercurio se incrementa con la adición del inhibidor (Compeau y

Bartha, 1984). En contraste, cuando el molibdato es utilizado para inhibir la reducción de sulfato, la metilación del mercurio se reduce en un 95% (Campeau y Bartha, 1985). Cultivos puros de *Desulfovibrio spp.* demostraron la habilidad de este grupo para metilar el mercurio en ambientes ricos en sulfato (Campeau y Bartha, 1985; Pak y Bartha, 1998a;1998b), pero cultivos puros de bacterias metanogénicas no podían metilar el mercurio (Pak y Bartha, 1998b). Lo que sugiere la posible existencia de una relación sintrófica entre estas dos comunidades microbianas.

### **2.2.1. Bacterias sulfato reductoras**

Las SRB fueron descubiertas en 1895 por Beijerinck y constituyen un grupo diverso de procariontes, caracterizadas por su capacidad de utilizar sulfato como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia, reduciéndolo sin asimilarlo (Fournier *et al.*, 2006). Además de su evidente importancia en el ciclo del sulfuro, son importantes reguladores de una variedad de procesos esenciales como ser; descomposición de materia orgánica, biodegradación de contaminantes cloroaromáticos, metilación del mercurio (Fauque, 1995; Barton, 1995) y remediación ambiental en diversos ambientes, razón por lo cual el interés en las SRB se ha incrementado debido al rol que desarrollan en virtud de sus potenciales interacciones dentro del ecosistema. Así, las bacterias sulfato reductoras son los principales contribuyentes de los sistemas microbianos modernos (microfilms), siendo responsables de más del 80% de la oxidación de carbono en ambientes marinos (Baumgartner *et al.*, 2006).

La reducción desasimilatoria del sulfato es un proceso clave en los ciclos biogeoquímicos del azufre, del carbono y del hierro, oxidándose la materia orgánica de forma anaerobia (Pallud & Van Cappellen, 2006). Los sustratos a partir de los cuáles las bacterias sulfato reductoras obtienen energía directamente van desde el hidrógeno hasta compuestos aromáticos, aunque la mayoría utiliza sustratos tales como acetato, lactato, piruvato y etanol, que son compuestos comunes en los ecosistemas (Pallud & Van Cappellen, 2006).

### 2.2.1.1. Diversidad ecológica

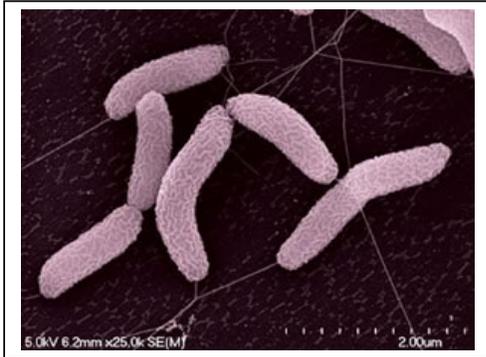


Figura 3333. Microfotografía de *Desulfovibrio desulfuricans*.

Eliminado: 3

Comúnmente se encuentran presentes en los sedimentos de diversos sistemas acuáticos, suelos, biofilms y contenido intestinal (Postage, 1984; Widdel, F., 1991). El ciclo de sulfuro en los hábitats acuáticos depende de la reducción del sulfato como un proceso primario y esta principalmente gobernado por miembros de esta subdivisión. Las bacterias gram-negativas son el tipo más común de SRB en sedimentos de aguas dulces (Hao *et al.*, 1996). Los típicos hábitats de las SRB son la parte superficial de los sedimentos acuáticos o zonas de aguas profundas anóxicas. Una amplia variedad de estas especies han sido aisladas de sedimentos marinos donde el sulfato presenta una elevada concentración en el agua de mar (28mM), siendo rara vez un factor limitante del crecimiento (Widdel, 1988). También se han encontrado en plantaciones de arroz (Gilmour *et al.*, 1992) y en digestores anaerobios de aguas residuales (Widdel, 1991). La diseminación desde los sedimentos anaerobios acuáticos hasta la columna de agua bien oxigenada puede ocurrir, las SRBs pueden sobrevivir por un tiempo, probablemente en un estado metabólico inactivo (Cypionka *et al.*, 1985). Asimismo, las bacterias sulfato reductoras que se conocen como oxidadores incompletos, tales como los Desulfovibrionales y la familia Desulfobulbaceae y aquellas conocidas como oxidadores completos, principalmente representados por la familia desulfobacteraceae pueden vivir en ambientes extremos halófilos, indicando que existen SRB halófilas tolerantes a las sales, las cuales posiblemente poseen nuevas vías metabólicas, siendo capaces de degradar anaeróbicamente compuestos complejos tales como la celulosa (Foti *et al.*, 2007).

Además, la densidad celular y la actividad significativa de las SRB se ha observado a nivel de zonas óxicas en sedimentos (interfase agua-sedimento) de agua dulce y marina (Bak y

Pfennig 1991a, 1991b; Jorgensen y Bak, 1991); el crecimiento de sulfato reductores en estos sitios puede ser explicada por la presencia de micronichos anóxicos.

Las SRB también son importantes miembros de la comunidad microbiana involucrada en la reducción de metales que ocurre en una variedad de ambientes incluyendo plantas productoras de aceites y gas, aguas de desecho de origen domestico, industrial y de minas (Singleton, 1993).

#### **2.2.1.2. Diversidad metabólica**

La diversidad metabólica de esta comunidad microbiana es muy extensa, participan directa o indirecta en la degradación de una amplia variedad de sustratos. El sulfato es utilizado como un aceptor terminal de electrones pero la mayoría de las SRB también son capaces de crecer sobre una amplia variedad de otros aceptores de electrones tales como tiosulfato, sulfito, sulfuro elemental y nitrato. Sin embargo, la concentración de aceptores de electrones alternativos es usualmente muy baja en sedimentos de lagos, suponiendo al sulfato como el más importante (Bak *et al.*, 1991). Entre los dadores de electrones simples tenemos al etanol, lactato e hidrógeno hasta compuestos más complejos como los hidrocarburos (Jorgensen, 1982; Rabus *et al.*, 1996; Krekeler *et al.*, 1998; Krumholz *et al.*, 1999; Steger *et al.*, 2004; Kaksonen *et al.*, 2004). Se conocía la imposibilidad de las SRB de utilizar carbohidratos, sin embargo, se han encontrado cepas de *Desulfovibrio* capaces de utilizar poliglucosa y nitrocelulosa como fuente de carbono (Petrova *et al.*, 2002). Además, son capaces de oxidar acetato a CO<sub>2</sub> y reducir el sulfato a sulfuro (Krumholz *et al.*, 1999) mediante el ciclo modificado de ácidos tricarbóxicos y vía acetil-CoA, siendo el segundo el más empleado por las SRB (Krumholz *et al.*, 1999).

Así también se sabe que muchas cepas de SRB pueden fijar N<sub>2</sub> y usar el nitrógeno de los aminoácidos como fuente de nitrógeno, por ejemplo *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 es capaz de utilizar nitrato como aceptor final de electrones, otras cepas de *Desulfovibrio* reducen nitrato a amonio (Lie *et al.*, 1999a), pues se ha observado que muchas cepas de *Desulfovibrio* poseen una nitrito reductasa específica que puede ser importante en la actividad transportadora de electrones mediada en la membrana (Barton *et al.*, 1983).

Adicionalmente las SRB pueden tolerar una variedad de metales pesados y sulfuro disuelto, Algunos de estos organismos son capaces de reducir  $\text{Fe}^{+3}$  a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o siderita ( $\text{FeCO}_2$ ) y  $\text{U}^{+4}$  a uranito ( $\text{UO}_2$ ), aunque no generen energía a partir de estos procesos (Lovley *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2001a).

Aunque tradicionalmente se consideraba a las SRB anaerobias obligadas, en los últimos años se ha reportado actividad sulfato reductora en ambientes aerobios demostrando un amplio rango ecológico de las SRB en relación a lo que se pensaba anteriormente (Canfiel y DeMarias, 1991; Cypionka, 2000; Baumgartner *et al.*, 2006). Se han realizado aislamientos de SRB después de exposiciones al oxígeno, probablemente la tolerancia al oxígeno se atribuye a la presencia de enzimas como la catalasa y superóxido dismutasa, las cuales se encontraron en *D. vulgaris*. Por lo que es importante determinar la extensión de estas enzimas en otras cepas y conocer la naturaleza de su regulación. También, se ha reportado una enzima que metaboliza el oxígeno, la rubredoxina u oxígeno oxireductasa, que reduce el oxígeno hasta agua en ciertos mecanismos de respiración (Cheng *et al.*, 1993). También se han reportado SRBs que sobreviven bajo condiciones óxicas (Marschall *et al.*, 1993; Eschemann *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 2002) y con capacidad de consumir  $\text{O}_2$  por respiración (Dilling y Cypionka, 1990; Dannenber *et al.*, 1992; Marschall *et al.*, 1993), probablemente como un mecanismo para evitar la exposición al oxígeno molecular (Eschemann *et al.*, 1999). Las SRB pueden ser aisladas de capas superficiales oxigenadas en números similares o mas altos a aquellos detectados en las zonas anóxicas (Jorgensen y Bak, 1991), además, las cepas aisladas de sedimentos oxicos muestran una alta tolerancia al oxígeno y capacidad de respirar oxígeno que las cepas de capas sedimentarias anóxicas (Sass *et al.*, 2002).

En ausencia de sulfatos, ciertas SRB pueden utilizar compuestos carbonados simples como donador y aceptor de electrones por un proceso llamado dismutación. Por ejemplo varias cepas de *Desulfovibrio* se desarrollan con la dismutación de piruvato, colina, malato, glicerol y dihidroxiacetona (Krumholz *et al.*, 1999).). Ciertas SRB son capaces de desproporcionar compuestos intermediarios de azufre. La desproporción se refiere a desintegrar compuestos reducidos de azufre, tales como tiosulfato, sulfito o azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), a un nuevo compuesto, el cual esta mas oxidado y/o mas reducido comparado con el substrato original (Bak y Cypionka, 1987, Thamdrup *et al.*, 1993; Cypionka, 1994; Janssen *et al.*, 1996). La

desproporción puede ser así considerada como un tipo de fermentación. Los pocos estudios exploratorios *in situ* acerca del proceso de desproporción encontraron que la mayor parte del tiosulfato (44%) añadido a los sedimentos de los lagos fue desproporcionado (Jorgensen, 1990). Esto sugiere que la desproporción es un proceso importante en los sedimentos de las lagunas, pero estudios suplementarios bajo condiciones *in situ* son necesarios para la verificación.

Los donadores de electrones utilizados por las SRB son principalmente compuestos de bajo peso molecular y la mayoría de estos son conocidos como productos fermentativos de la degradación bacteriana de carbohidratos, proteínas y otros compuestos de detritos. Unas pocas SRB son capaces de degradar complejos moleculares como compuestos aromáticos (Widdel, 1988), siendo los donadores de electrones más importantes el H<sub>2</sub>, acetato, lactato y propionato (Sorensen *et al.*, 1981; Postgate, 1984; Hao *et al.*, 1996; Fukui *et al.*, 1999). Algunos lagos muestran un cambio brusco de acetato en la zona de sulfato reducción sugiriendo que el acetato es un importante donador de electrones (Bak y Pfenning, 1991; Hordijk *et al.*, 1994). Sin embargo, Sass *et al.* (2002) encontró que la utilización bacteriana de lactato domina en lagos oligotróficos con un incremento relativo en la utilización bacteriana de acetato con la profundidad del sedimento. Un reciente estudio muestra que el propionato fue utilizado más rápidamente comparado con el acetato y butirato en sedimentos de lagos ricos en materia orgánica (Purdy *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Es muy difícil identificar y cuantificar la importancia de los donadores de electrones específicos por las bajas concentraciones encontrados y los rápidos cambios que sufre por la actividad la bacteria, por lo que es necesario el desarrollo de futuras metodologías en orden de entender este aspecto del ciclo del azufre. Así, debido a su elevada diversidad metabólica en diversos ambientes, estos han sido poco estudiados y entendidos hasta la actualidad (Alvarez *et al.*, 2000).

Las SRB frecuentemente compiten con las bacterias metanógenas debido a la alta afinidad por la mayoría de los substratos comunes en sedimentos, tales como el H<sub>2</sub> y acetato (Laanbroek & Pfenning, 1981; Laanbroek & Veldkamp, 1982; Szewzyk & Pfenning, 1990; Li *et al.*, 1996; Pallud & Van Cappellen, 2006). Las SRB y las bacterias productoras de metano pueden coexistir cuando substratos no-competitivos (metilaminas) están disponibles (Lovley

& Klug, 1983a; King, 1984; Lomans *et al.*, 1999) pero la concentraciones de estos substratos es usualmente baja en los sedimentos de lagos y coexisten sobre substratos no-competitivos que no son considerados importantes en los sedimentos de los lagos (Capone y Kiene, 1988).

### **2.2.1.3. Taxonomía y clasificación filogenética**

Las SRB son un grupo fisiológicamente complejo y varias propiedades han sido utilizadas en los sistemas tradicionales de clasificación (Castro *et al.*, 2000) (Tabla 1). Sin embargo, el análisis de secuencias del RNAr permitió realizar la organización de varias especies de SRB dentro de 4 grupos distintos: SRB gram-negativas mesofílicas; SRB Gram-positivas formadoras de esporas; SRB termofílicas y SRB arqueas termofílicas. Todos estos grupos se caracterizan porque utilizan el sulfato como aceptor final de electrones durante la respiración anaerobia con la consecuente producción de sulfuro de hidrógeno H<sub>2</sub>S. Por otra parte Daly *et al.* (2000), empleando secuencias de SRB recuperadas de las bases de datos “GenBank”, “EMBL” y “RPD”, clasificaron a las SRB mas conocidas y representativas, restringiéndose a géneros mesofílicos dentro de la subdivisión delta-proteobacteria y gram (-/+), géneros ampliamente distribuidos en diversos ecosistemas y varios microambientes (Balows *et al.*, 1994), agrupándolos en seis sub-grupos filogenéticos distintos; *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobulbus* (DBB), *Desulfacterium* (DBM), *Desulfobacter* (DSB), *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (DCC) y *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (DSV), ninguno de ellos pertenece al grupo de SRB termofílicas o arqueas. En este estudio se realizó el estudio de los subgrupos propuestos según la clasificación de Daly *et al.* (2000) (Figura 4) a excepción del grupo DBM, a continuación se describen las características generales de cada uno de ellos.

**Tabla 1111. Características importantes en la clasificación de bacterias sulfato reductoras (Castro *et al.*, 2000)**

Eliminado: 1

	Shape	Motility	GC content of DNA (%)	Desulfovirin	Cytochromes	Oxidation of acetate	Growth temp. (°C)
<b>Gram-negative mesophilic SRB</b>							
<i>Desulfobulbus</i>	lemon to rod	-/+	59–60	–	b, c, c <sub>3</sub>	I <sup>a</sup>	25–40
<i>Desulfomicrobium</i>	ovoid to rod	+/-	52–67	–	b, c	I	25–40
<i>Desulfomonas</i>	rod	–	66	+	c	I	30–40
<i>Desulfovibrio</i>	spiral to vibrioid	+	49–66	+/-	c <sub>3</sub> , b, c	I	25–40
<i>Desulfobacter</i>	oval to rod	+/-	44–46	–	–	C <sup>b</sup>	20–33
<i>Desulfobacterium</i>	oval to rod	+/-	41–52	–	b, c	C	20–35
<i>Desulfococcus</i>	spherical or lemon	-/+	46–57	+/-	b, c	C	28–35
<i>Desulfomonile</i>	rod	–	49	+	c <sub>3</sub>	C	37
<i>Desulfonema</i>	filaments	gliding	35–42	+/-	b, c	C	28–32
<i>Desulfosarcina</i>	oval rods or coccoid, packages	+/-	51	–	b, c	C	33
<b>Gram-positive spore-forming SRB</b>							
<i>Desulfotomaculum</i>	straight to curved rods	+	48–52	–	b, c	I/C	most 25–40, some 40–65
<b>Bacterial thermophilic SRB</b>							
<i>Thermodesulfobacterium</i>	vibrioid to rod	-/+	30–38	–	c <sub>3</sub> , c	I	65–70
<b>Archaeal thermophilic SRB</b>							
<i>Archaeoglobus</i>	coccoid	+/-	41–46	–	n.r. <sup>c</sup>	I	64–92

<sup>a</sup>I, incomplete.  
<sup>b</sup>C, complete.  
<sup>c</sup>n.r., not reported.

#### a. Desulfotomaculum (DFM) – Subgrupo (1)

Este subgrupo incluye a los géneros: *Desulfotomaculum* y *Desulfoesporosinus*. El primero ha sido el más estudiado, son bacilos rectos o curvados, móviles por la presencia de flagelos peritricos o polares, con pared celular, mesófilas, son las únicas SRB gram-positivas de bajo contenido GC, no contienen desulfovirdina, además forman esporas volviéndose de este modo resistentes a condiciones adversas (deseccación y oxidación del medio ambiente) y le permite subsistir en una gran variedad de medios. (Londry *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2000). Recientemente se han descubierto que algunas especies pueden ser consideradas termofílicas, tal como ocurre con *Desulfotomaculum thermocisternum*, que puede encontrarse en ambientes con temperaturas próximas a los 100°C en el subsuelo marino (Imachi *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2002). En general, este subgrupo se encuentra en todos los ambientes naturales, sedimentos, aguas, inclusive en el tracto digestivo de animales neonatos (Deplancke *et al.*, 2000). También han sido aisladas de perfiles de lignito cuaternario (Detmers *et al.*, 2001), depósitos de petróleo crudo (Pilsen *et al.*, 1996; Imachi *et al.*, 2000), capaces de utilizar hidrógeno como fuente de energía, que les otorga un carácter quimiolitótrofo (Imachi *et al.*, 2000). Este género tiene además la capacidad de realizar la dismutación del tiosulfato (Jackson y McInermey, 2000). Además Daly *et al.* (2000), indican que este subgrupo muestra una gran distancia en relación a los otros cinco subgrupos



**b. Desulfobulbus (DBB) – Subgrupo (2)**

Este grupo está estrechamente relacionado con los géneros *Desulfocapsa*, *Desulforhopalus* y *Desulfofustis* dentro de la familia Desulfobacteriaceae. Este grupo presenta tres especies *Desulfobulbus elongatus*, *Desulfobulbus marinus* y *Desulfobulbus propionicus*, se caracterizan por ser células ovoides (forma de limón), no forman esporas, no contiene desulfovirdina, presentan un flagelo polar único, algunas especies presentan motilidad y otras no, tienen una posición dentro de la subclase delta de las proteobacterias. A diferencia del primer sub-grupo Desulfotomaculum, *Desulfobulbus* es mesofílica gram-negativa, al igual que todos los demás sub-grupos de SRB (Balows *et al.*, 1994), por lo que se desarrollan entre 20 a 40°C. Utilizan propionato como donador de electrones oxidándolo de manera incompleta hasta acetato, además son capaces de subsistir con lactato, etanol, H<sub>2</sub>, acetato, formato y bicarbonato (Benoit *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002a), utilizando alguno de estos compuestos incluso en ausencia de sulfato (Balows *et al.*, 1994). También se ha visto que este subgrupo puede utilizar nitrato (Ito *et al.*, 2002b) como aceptor final de electrones por lo que es capaz de competir con bacterias nitrificantes. Además, utilizan oxígeno adquiriendo un carácter aerotolerante y probablemente facultativo (Ito *et al.*, 2000a), además el efecto del oxígeno durante la formación de microcapas, produce etapas de latencia que preceden una composición predominante de *Desulfobulbus* y *Desulfovibrio*, lo explica su presencia en diversos ambientes debido a su adaptabilidad a la química de su entorno (Santegoeds *et al.*, 1999). Este subgrupo puede realizar la dismutación de azufre, sulfuro, sulfito y tiosulfato (Finster *et al.*, 1998), con azufre elemental como compuesto intermediario. Por otra parte, se ha reportado que *Desulfobulbus propionicus* (1pr3) realiza la metilación del mercurio en cultivos puros (Widdel y Bak, 1991; Benoit *et al.*, 2001).

**c. Desulfobacterium (DBM) – subgrupo (3)**

El género *Desulfobacterium* es un grupo nutricionalmente versátil, con formas semejantes a bastoncillos de forma oval o casi esférica, presenta capacidades especiales en cuanto a degradación de compuestos orgánicos, como la descomposición de hidrocarburos. Las especies de este género son fundamentalmente marinas y requieren elevadas concentraciones de cloruro de sodio. Al igual que *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* es

potencialmente importante para la metilación del mercurio y no tolera condiciones aerobias (Widdel y Bak, 1991; King *et al.*, 2000).

#### **d. Desulfobacter (DSB) – Subgrupo (4)**

Una de las características más sobresalientes de este subgrupo es su capacidad de oxidar de manera completa y efectiva al acetato debido a que poseen toda la maquinaria funcional para realizar el ciclo del ácido cítrico (Balows *et al.*, 1994). Además se ha visto la versatilidad de este grupo de utilizar gran variedad de substratos. Son bacterias ovoides a semiesféricas parecidas a *Desulfovibrio*, normalmente mótils y se desplazan mediante un flagelo polar único, mesófilas, no producen esporas, no tiene desulfoviridina.

Los requerimientos salinos y localización, sugirieron que pertenecía a un género marino al igual que *Desulfobacterium*. Sin embargo, *Desulfobacter postgatei* fue aislada a partir de sedimentos lacustres, aunque en bajo número, determinándose además que géneros de la familia desulfobacteraceae son capaces de realizar vías metabólicas exclusivas, las mismas que les permiten vivir en ambientes halófilos y extremadamente halófilos (Balows *et al.*, 1994; Foti *et al.*, 2007). La relación en composición entre *Desulfobacter* y *Desulfovibrio*, el género más diverso y expandido, es variable según el ambiente. De manera general, se ha visto que en sedimentos marinos *Desulfovibrio* se presenta en mayor porcentaje, pero en sedimentos lacustres salinos la relación es inversa (Fry *et al.*, 1997; Macalady *et al.*, 2000; Zhang y Fang, 2001). Además, se ha identificado al género *Desulfobacter* como uno de los principales metiladores de mercurio en medios que contienen lactato y acetato (Widdel y Bak, 1991; King *et al.*, 2000).

#### **e. Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina (DCC) – Subgrupo (5)**

Los tres géneros de este subgrupo son estructuralmente diferentes, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* se agrupa en células cocoides virtualmente inmóviles y *Desulfonema* es el único género de SRB multicelular filamentosa motil por deslizamiento. Sin embargo, el análisis mediante el 16S relaciona a este subgrupo de manera estrecha con la familia Desulfobacteriaceae en el orden Desulfosarcinales, que comparte con los géneros *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* y de manera más distante con *Desulfobulbus*.

Morfológicamente presentan formas de bastoncillos ovalados. La característica metabólica de este subgrupo implica la oxidación completa de sustratos (Harás *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000) tales como formiato, acetato, acetona, propionato, butirato, isobutirato, valeriato, metilbutirato, caproato, malato, piruvato, succinato, fumarato, malato, benzoato, etanol, propanol, butanol, hidrógeno y CO<sub>2</sub> (Drzyzga *et al.*, 1996; Fukui *et al.*, 1999)

Algunas cepas han sido aisladas de medios contaminados por hidrocarburos. *Desulfococcus* ha sido aislado de sedimentos de aguas dulces y también se desarrolla en medios salinos; mientras que *Desulfosarcina* es primordialmente marino. Este subgrupo ha sido detectado en la quimioclina, entre el ambiente aerobio y anaerobio, por lo que podría tener la capacidad de tolerar el oxígeno (Widdel y Bak, 1991).. *Desulfococcus* es uno de los géneros más importantes en cuanto a la metilación del mercurio, tercero después de *Desulfomicrobium* y *Desulfobacter* (Widdel y Bak, 1991; King *et al.*, 2000).

#### **f. Desulfovibrio-Desulfomicrobium – subgrupo (6)**

La familia Desulfovibrionaceae incluye a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, aunque otros dos géneros podrían ser incorporados dentro la misma (*Desulfohalobium* y *Desulfonatrum*). Se ha propuesto una reclasificación para *Desulfomonas pigra* a *Desulfovibrio piges* basado sobre el análisis de la secuencia del 16S rRNA (Holt, 1993), sin embargo, *D. piges* es diferente de otros desulfovibrios en su motilidad (no motil) y forma (bastón versus vibrioide). Se generaron recientemente dos descripciones para: *Desulfohalobium* (representado por *D. retbaense*; GenBank número de acceso U48244) y *Desulfonatrum* (representado por *D. lacustre*; número de acceso GenBank Y14594) y aun no han sido oficialmente incorporados a la familia Desulfovibrionaceae.

Morfológicamente son en general vibrioides, espiralados u ovoides, no forman esporas, contienen desulfovirdina, son motiles (Castro *et al.*, 2000). Siendo la característica más sobresaliente su capacidad de adaptarse a diversos hábitats gracias a sus intrincadas estrategias metabólicas que les permiten subsistir.

Métabolicamente se diferencian de la familia Desulfobacteriaceae por realizar la oxidación incompleta de los substratos con la formación final de acetato durante la fermentación (Voordouw *et al.*, 1995).

Una de las características más importantes es su capacidad para tolerar oxígeno y en algunos casos, incluso consumirlo (Zinkevich y Beech, 2000; Loubinoux *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2006), son capaces de subsistir bajo estrés oxidante en presencia de incluso 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$  (la mayoría no sobrevive por encima de 0.24 a 0.48  $\mu\text{M}$ ) en el torrente sanguíneo humano (Schoenborn *et al.*, 2001), reaccionando inicialmente con quimiotaxis de aglomeración (Krekeler *et al.*, 1997), y con actividad superoxidasa mediante proteínas tipo ruberitina y ruberedoxina (Bonomi *et al.*, 1996; Lummopio *et al.*, 2001), neelaredoxina (Silva *et al.*, 2000) y otros mecanismos aun no estudiados en profundidad (Dos Santos *et al.*, 2000).

El género se encuentra desde ambientes salinos, donde han sido más estudiados hasta sedimentos de agua dulce y son selectivamente aislados en medios que contienen  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , acetato, lactato o etanol, aunque también crecen con otros substratos orgánicos como el piruvato, malato, lactato y fumarato (Widdel y Bak, 1991; Voordouw, 1995; Luca *et al.*, 2001; Steger *et al.*, 2002; Foti *et al.*, 2007). El género *Desulfomicrobium* en cuanto a sus características fisiológicas y nutricionales es muy similar a *Desulfovibrio*, tiene forma de bastoncillo y carece de desulfovirdin.

Sin embargo, la enorme diversidad de *Desulfovibrio* ha hecho difícil el diseño y uso de marcadores moleculares basados en el 16S, para su detección en los distintos ecosistemas (Daly *et al.*, 2000). Sin embargo, nuevas estrategias se están diseñando con éxito, las cuales se basan en genes funcionales del metabolismo energético como los de la DSR (Hipp *et al.*, 1997).

### **2.2.2. Arqueas metanógenas**

Las metanógenas pertenecen al dominio arquea (Woese *et al.*, 1990) y al reino Euryarchaeotaea (Woese *et al.*, 1990; Boone *et al.*, 1993), constituyéndose en el único grupo de microorganismos que produce metano ( $\text{CH}_4$ ) como producto estequiométrico de su metabolismo. El metano es el producto final de la descomposición microbiana de la materia

orgánica en ambientes anaerobios tales como los sedimentos de aguas dulces y el tracto intestinal de los animales. Aproximadamente dos tercios del metano se difunde dentro de la zona aerobia, donde es oxidado por bacterias metanotróficas, otro porcentaje es reservado conduciendo a la formación de depósitos de metano, pero la mayor parte escapa a la atmósfera donde es fotoquímicamente convertido a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Seifert *et al.*, 2006). La concentración en la atmósfera de metano se han incrementado constantemente durante los últimos 300 años, probablemente debido a la expansión de los cultivos de arroz y la acción de la vida rumiante (Conrad, 1996), generando una preocupación creciente a nivel mundial (Seifert *et al.*, 2006).

En sedimentos anaerobios de agua dulce la glucosa de la celulosa vegetal se descompone completamente hasta CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. Esta reacción aparentemente simple no es catalizada por un simple microorganismo sino por una asociación sintrófica de microorganismos a través de una serie de pasos. Primero la glucosa se fermenta hasta acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> o acetato, formiato y H<sub>2</sub>. Estas fermentaciones son llevadas por bacteria estrictamente anaerobias y/o protozoarios. En un segundo paso, el producto resultante se fermenta hasta convertirse a metano (Zinder, 1993). Se pensaba que los organismos mediadores de las reacciones de formación del metano eran originariamente bacterias, pero ahora se los reconoce como a un dominio filogenético separado.

La metanogénesis es la única vía por la cual las arqueas metanógenas pueden obtener energía para su crecimiento y estos son los únicos organismos conocidos como productores de metano como un producto catabólico final. Ellos solo pueden utilizar acetato, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, formiato y/o otras fuentes de carbono tal como el metanol, metiltioles y metilaminas como substratos de energía.

A pesar de la elevada especialización, no todas las metanógenas están estrechamente relacionadas filogenéticamente. Como se refleja, por ejemplo, en las diferencias de la composición de la pared celular (Sprott y Beveridge, 1993; Kandler y Klönig, 1998), en las diferentes condiciones óptimas de crecimiento; así algunas crecen a temperaturas óptimas por debajo de 20°C y otras a temperaturas cercanas a la ebullición del agua (Boone *et al.*, 1993).

### 2.2.2.1. Diversidad ecológica

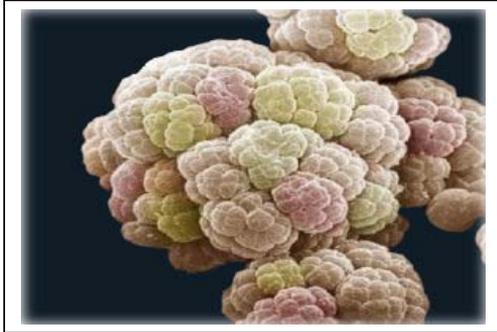


Figura 5555. Microfotografía de *Methanosarcina mazei*.

Eliminado: 5

Las arqueas son los menos entendidas en términos de diversidad, fisiología, genética y ecología (Bong-Soo *et al.*, 2005). Estudios filogenéticos moleculares revelaron que las poblaciones ambientales de arqueas son diversas y complejas y que frecuentemente consisten de miembros no cultivables y no identificables. Además, cuando las características filogenéticas de la comunidad de arqueas se relacionan con el ambiente es posible inferir importantes visiones dentro las funciones fisiológicas y roles ecológicos de sus comunidades (Takai *et al.*, 2001).

El continuo desarrollo de herramientas moleculares para los estudios ambientales de microorganismos (Head *et al.*, 1998; Insam, 2001) ha facilitado la caracterización de las comunidades de metanógenas. Algunos estudios moleculares (Bintrim *et al.*, 1997; Jurgens *et al.*, 1997; Buckley *et al.*, 1998) han demostrado la ubicuidad de las mismas. Existiendo tres diferentes ecosistemas en los cuales las metanógenas han sido estudiadas y aisladas (Garcia *et al.*, 2000). El primero en tierras húmedas, cieno y digestores de materia orgánica, el estudio más representativo lo constituyen los suelos de campos de arroz, en la cual la diversidad y estructura de las comunidades metanógenas han sido examinadas con marcadores moleculares tales como el 16S rRNA (ribosomal) y el mcrA (funcional) (Grosskopf *et al.*, 1998a; Lueders *et al.*, 2001). Las poblaciones metanógenas también han sido caracterizadas en lagos (Falz *et al.*, 1999; Nusslein *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002; Earl *et al.*, 2003) y sedimentos marinos (Marchesi *et al.*, 2001; Purdy *et al.*, 2002) de una variedad de regiones geográficas. En muchos suelos de arrozales y sedimentos de lagos, la acetotrofia ha mostrado ser la principal vía para la metanogénesis (Winfrey and Zeikus, 1979; Kuivila *et al.*, 1989; Rothfuss and Conrad, 1993). En aquellos hábitat, la proporción de

CH<sub>4</sub> originado por la acetogénesis es cercano al 67% del porcentaje teórico del CH<sub>4</sub> producido en suelos y sedimentos (Conrad, 1999).

El segundo en el tracto digestivo animal, las metanógenas están directamente involucradas en el proceso digestivo. Se han aislado especies de un amplio rango de ambientes: intestino de artrópodos terrestres (Hackstein and Stumm, 1994), intestino de la termita (Ohkuma *et al.*, 1995; Leadbetter *et al.*, 1998; Ohkuma *et al.*, 1999), el rumen (Miller *et al.*, 1986; Sharp *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2004). En rumiantes, la mayoría de los productos formados de la fermentación son reabsorbidos al torrente sanguíneo para ser utilizados como nutrientes.

Finalmente, también se las ha encontrado en ambientes extremos donde la materia orgánica esta ausente, donde el metano es producido solamente del hidrógeno geoquímico. Las salidas hidrotermales representan tales ecosistemas (Jones *et al.*, 1983; Jeanthon *et al.*, 1999; Takai and Horikoshi, 1999), suelos contaminados por compuestos hidrocarbonados (Dojka *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2002). Además, metanógenas hipertermofílicas han sido aisladas de ambientes extremos (Jones *et al.*, 1983; Jeanthon *et al.*, 1999) y análisis filogenéticos moleculares han sido conducidos (Takai y Horikoshi, 1999).

#### **2.2.2.2. Diversidad metabólica**

De acuerdo a los requerimientos nutricionales las metanógenas han sido separadas en tres categorías.

1. Hidrogenótrofos (38 especies) que oxida el H<sub>2</sub> y reduce el CO<sub>2</sub> para formar metano y en medio de aquellos que son capaces de oxidar formato para la formación de metano.
2. Metilótrofos (20 especies), los cuales utilizan compuestos metil como el metanol, metilaminas o dimetilsulfuros para producir metano. El H<sub>2</sub> también utilizado como un donador de electrones externo. Trece especies son metilótrofos obligados.
3. Acetoclásticos o acetotróficos (9 especies), utilizan el grupo metil del acetato para producir CH<sub>4</sub>; solo dos especies son acetotrofos obligados.

#### **2.2.2.3. Taxonomía y clasificación filogenética**

La clasificación taxonómica de las metanógenas se ha realizado mediante varios métodos, entre los que se incluyen el estudio de su morfología, motilidad, imágenes por microscopia



substratos como  $H_2/CO_2$ , 2-propanol, formato, y metanol para producir  $CH_4$ . La familia *Methanothermaceae* consiste de un único género termofílico extremo hidrógeno trofo.

**b. Orden *Methanococcales***

Incluye a dos familias, *Methanococcaceae* y *Methanocaldococcaceae*, y cuatro géneros de hidrógeno trofos principalmente de ambientes marinos y costeros. La mayoría de las especies son capaces de utilizar  $H_2$  y formato como donadores de electrones.

**c. Orden *Methanomicrobiales***

Comprende a tres familias y nueve géneros de metanógenas hidrógeno trofas. La familia *Methanomicrobiaceae* incluye a especies aisladas de varios ambientes (rumen, sedimentos marinos, etc). La familia *Methanocorpusculaceae* incluye a tres géneros que utilizan  $H_2/CO_2$  y formato como substratos. La familia *Methanospirillaceae* es una familia nueva con un único género; los miembros se han reportado en varios habitats y son capaces de utilizar diferentes donadores de electrones para la metanogénesis del  $CO_2$ .

**d. Orden *Methanosarcinales***

Recientemente propuesto por Boone (Boone *et al.*, 1993). Este reagrupa a todos las metanógenas acetotrofos y/o metilotrofos dentro de dos familias. La familia *Methanosarcinaceae* que incluye a seis géneros de metanógenas muy versátiles aisladas de varios habitats y que son capaces de utilizar  $H_2/CO_2$ , acetato o compuestos metil como substratos. La familia *Methanosaetaceae* incluye a un único género de metanogena acetotrofica obligada.

**e. Orden *Methanopyrales***

Es un nuevo orden de metanógenas hipertermofílicas, las cuales no están relacionadas con todas las otras metanógenas conocidas. El orden incluye una única *Methanopyraceae* y una especie *Methanopyrus kandleri*.

Se ha determinado la secuencia del DNA del genoma total *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain DH) (Smith *et al.*, 1997). Recientemente, la secuencia del DNA para *Archaeoglobus fulgidus* también ha sido publicado (Klenk *et al.*, 1997). Esta arquea sulfato-reductora filogenéticamente está más estrechamente relacionada con el género *Methanosarcinales*, con quien comparte muchas características bioquímicas en común.

### **2.3. ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES**

El estudio de los microorganismos representa una dificultad particular ya que por su tamaño no pueden ser observados como individuos a simple vista, por lo que la categorización es extremadamente ardua y pobremente estudiada. Métodos anteriores se limitaron a entender la estructura comunitaria y grupos microbianos mediante lo que podía cultivarse por técnicas de enriquecimiento y aislamiento en el laboratorio. Sin embargo, estos métodos podrían no revelar la diversidad microbiana apropiada en sedimentos debido a su baja selectividad (Amann *et al.*, 1995). Por ejemplo, en el caso de las bacterias sulfato reductoras, se encontró que el conteo de unidades formadoras de colonia (ufc) aparentemente subestima la población natural por al menos un factor de  $10^3$  - $10^4$  (Jorgense, 1978a). La estimación de este cálculo irreal se basó en la comparación del conteo de células viables y la medición de elevadas tasa de sulfato reducción. Así mismo, la introducción del número más probable (MPN) condujo al conteo de un elevado número de células (Jorgenes y Bak, 1991; Vester y Ingvorsen, 1998; Haglund *et al.*, 2003; Leloup *et al.* 2004), además que el cálculo de la tasa de sulfato reducción en estos estudios continuaron siendo elevados siendo 100 veces más elevados que la tasa medida en cultivo puros de crecimiento exponencial, indicando que las poblaciones de SRB continúan siendo subestimadas. Así, que el inconveniente más obvio de las técnicas basados en cultivos es que estas solo detectan un porcentaje mínimo del total de células presentes en el ecosistema (Amann *et al.*, 1995). Por lo tanto, puede argüirse que la biodiversidad microbiana aún permanece sin ser explorada para nuevos genes o cluster de genes que podrían ser explotados para un mejor entendimiento de los procesos metabólicos en la biosfera.

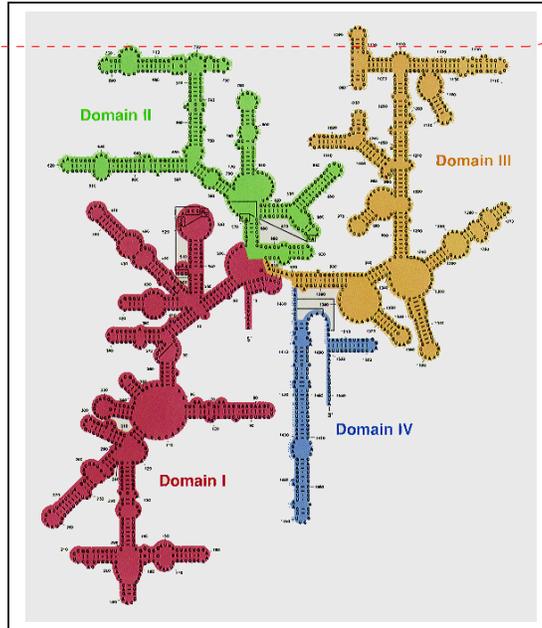
En contraste, la introducción de técnicas moleculares basada en la amplificación y detección del gen del 16S rRNA (p.e. PCR e hibridización) mostró un panorama más realista de la estructura comunitaria (Koizumi *et al.*, 2003b; Spring *et al.*, 2000; Wobus *et al.*, 2003; Leloup *et al.* 2004; Baumgartner *et al.*, 2006) ya que permite la identificación específica de grupos filogenéticos en un ambiente particular. Por consiguiente, organismos que son rutinariamente cultivados no son necesariamente representativos de lo que se observa usando las técnicas moleculares. El progreso de las técnicas moleculares es rápido y sobre la pasada década, se han desarrollado métodos fiables para determinar la filogenia microbiana basada sobre la información de la secuencia de genes y métodos para recuperar genes directamente de las muestras ambientales se han desarrollado para estudios de ecología microbiana a partir de cultivos y de muestras ambientales (Devereux *et al.*, 1992; Ramsing, Kuhl y Jorgensen 1993M Purdy *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Haglund *et al.*, 2003; Woyke *et al.*, 2006). Los métodos moleculares que evalúan la diversidad microbiana tienen que superar el sesgo de los cultivos y han sido exitosamente utilizados para elucidar la diversidad taxonómica de varios ambientes sugiriendo una significativa diversidad de microorganismos desconocidos e incultivables que contribuyen de manera favorable o no al ecosistema en general (Abed, R.M. *et al.*, 2002). En ecosistemas acuáticos, la aplicación de técnicas de biología molecular se ha desarrollado con gran interés en los últimos años, lo que ha representado un gran avance en el conocimiento de los mismos (Palmer M. *et al.*, 2000; Holmer M. y Storkholm P., 2001; Kent A. y Triplett E., 2002; Leloup *et al.* 2004; Karr *et al.*, 2005).

El reconocimiento de una gran diversidad de microorganismos en diversos ambientes es solo el comienzo de una nueva era en la microbiología molecular, por lo tanto, la integración de técnicas de estudio de la microbiología tradicional junto con metodologías moleculares, incluyendo los avances que suponen las técnicas de genómica y metagenómica sin duda contribuirá a un mejor conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas.

### 2.3.1. Diversidad microbiana basada en el 16S rRNA

Figura 7777. Estructura secundaria del 16S rRNA para *E. coli*, basada en análisis de secuencia.

La mayoría de los estudios están basados sobre la aplicación del 16S rRNA como marcador filogenético para describir la diversidad, riqueza y la estructura poblacional bacteriana en una gran variedad de ambientes naturales (Festl *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 1992; Sessitsch, *et al.*, 2002; Leloup *et al.* 2004; Nercessian *et al.*, 2005). El RNA ribosomal se ha constituido como el principal cronómetro molecular, formando parte integral de la maquinaria de síntesis proteica básica de toda célula viva, estando



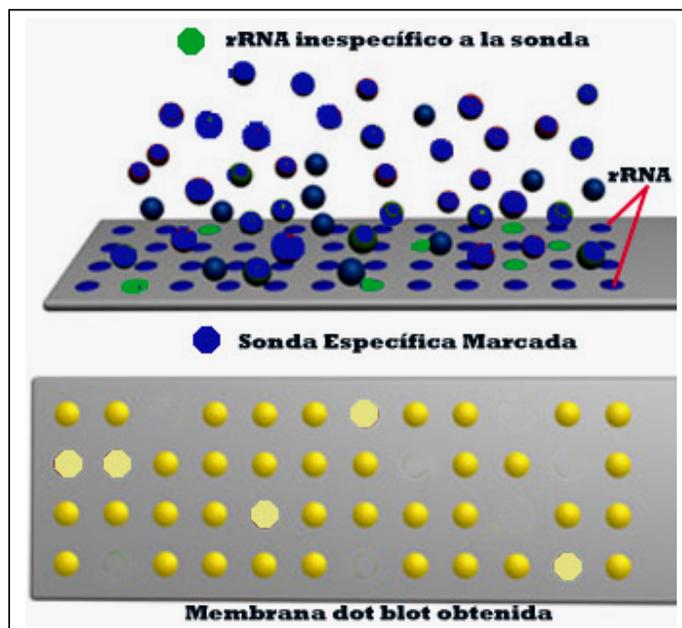
Eliminado: 7

universalmente distribuido en todos los seres vivos, con alguna diferencia menor entre los reinos; su función es constante en toda la escala biológica y los tipos existentes presentan una variación en la longitud de la molécula adecuada para medir cualquier distancia filogenética. El RNA ribosomal posee estructuras que se han conservado durante el transcurso de la evolución, formada por regiones de secuencias variables que contienen información de bajo nivel filogenético, mientras que las regiones con secuencias conservadas contienen información de eventos evolutivos más tempranos, siendo un excelente marcador molecular para la reconstrucción de la mayoría de las relaciones filogenéticas (Devereux y Stahl, 1992; Embley y Stackbrandt, 1996). La comparación de secuencias del gen 16S rRNA reveló diferencias únicas entre los diferentes grupos microbianos filogenéticos, encontrando patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos (Olse *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986).

### 2.3.2. Extracción del 16S rRNA de sedimentos

El aislamiento del RNA a partir de muestras sedimentarias es fundamental para la determinación de la diversidad y estructura de las poblaciones microbianas. Se han identificado variables críticas en la eficiencia de la extracción tales como la concomitante extracción de contaminantes orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos) o la susceptibilidad del rRNA a la degradación por nucleasas, por lo tanto la obtención de dicha molécula es laboriosa y compleja (Sessitsch *et al.*, 2002). No obstante, diversos estudios se han desarrollado sobre la extracción del 16S rRNA (Ogram *et al.*, 1995, Ravenschlag *et al.*, 2000, Alm & Stahl, 2000, Frisher *et al.*, 2000, Sessitsch *et al.*, 2002, van Keulen, *et al.*, 2004) y han sido aplicadas al estudio de la diversidad y abundancia de comunidades microbianas.

Se han reportado varios métodos para el aislamiento de RNA de suelos y sedimentos (Felske *et al.*, 1996, Fleming *et al.*, 1998, Griffiths *et al.*, 2000, Weinbauer *et al.*, 2002), los cuales, usualmente aplican procedimientos de lisis similares para liberar a las células bacterianas y extraer, posteriormente los ácidos nucleicos. Muchos protocolos usan condiciones ácidas para remover proteínas, lípidos y DNA usando fenol y cloroformo, manteniendo el RNA en la fase acuosa (Moran *et al.*, 1993, Devereux *et al.*, 1996, Alm & Stahl, 2000, McGregor *et al.*, 2001, Sessitsch *et al.*, 2002, van Keulen, *et al.*, 2004). En estos casos, el uso de agentes caotrópicos ha sido recomendado (Felske *et al.*, 1996). De tal manera, la elección del protocolo apropiado para el aislamiento de RNA es esencial para la caracterización subsecuente de las poblaciones bacterianas.



### 2.3.3. Hibridación molecular cuantitativa

Figura ~~8888~~. Esquema de la hibridación molecular dot blot.

Eliminado: 8

La hibridización molecular es una de las técnicas moleculares que permite la detección del 16S rRNA empleando sondas marcadas. La presencia del 16S rRNA en grandes cantidades en procariontes (Amman, R. I. *et al.*, 1995), permitió desarrollar sondas específicas para la secuencia 16SrRNA permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras requeridas para el estudio ecológico, al mismo tiempo que posibilitan la detección directa de microorganismos concretos en las muestras. La hibridización permitió mejorar las estimaciones de la abundancia mostrando una estratificación de los diferentes grupos filogenéticos de la comunidad microbiana (Risatti *et al.*, 1994; Ramsing *et al.*, 1993; Devereux *et al.*, 1996; Ramsing *et al.*, 1996; Teske *et al.*, 1996). La hibridización en membrana o dot-blot del RNAr extraído de muestras ambientales proporciona una fiable estimación de la abundancia relativa de poblaciones activas con una buena sensibilidad sin tener en cuenta el tipo de muestra. La estructura comunitaria analizada por este método es más cuantitativo que aquellos desarrollados por PCR, debido a que el sesgo introducido durante la amplificación del ADN puede ser evitado (Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki y Giovannonni, 1996).

La hibridización molecular se basa en la detección de una secuencia dentro del genoma, a partir de una mezcla de simples cadenas de dos fuentes de ácidos nucleicos mediante el reconocimiento químico (complementariedad) correspondiente entre pares de base de una “sonda” (oligonucleótido) sintetizada a partir del rRNA extraído de cultivos puros y el ácido nucleico investigado (target) el que típicamente consiste de un complejo (población heterogénea de moléculas de ácidos nucleicos) que proviene de muestras de diverso origen. Por lo que la hibridización del 16S rRNA genera valiosa información acerca de la caracterización y abundancia de comunidades microbianas y en algunos casos acerca de la actividad bacteriana. Sin embargo, la utilización de sondas en la hibridización de ácidos nucleicos extraídos de muestras sedimentarias resulta más difícil y laboriosa en comparación a que estudios análogos en otros ambientes (Farrelly *et al.*, 1995)

#### **2.3.4. Estudio de comunidades microbianas de SRB y MA mediante hibridización molecular**

Por más de una década, la cuantificación de la comunidad microbiana por métodos moleculares tal como la hibridización fluorescente *in situ* (FISH) y la hibridización en

membrana o dot-blot han sido ampliamente utilizadas en ambientes naturales (Amann *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 1995; Llobet-Brossa *et al.*, 1998; Minz *et al.*, 1999; Ravenschlag *et al.*, 2000; Ravenschlag *et al.*, 2001; Tuschak *et al.*, 1999). Devereux y colaboradores (1992) y Daly y colaboradores (2000) diseñaron sondas para detectar la secuencia del 16S rRNA del grupo SRB, las cuales fueron utilizadas exitosamente para demostrar la presencia de SRB en diversos hábitats como biofilms anaeróbicos (Kane *et al.*, 1993; Raskin *et al.*, 1996), sedimentos marinos y de aguas dulces (Sahm *et al.*, 1999; Devereux *et al.*, 1996b; Purdy *et al.*, 1997; Trimmer *et al.*, 1997), lodo activo (Manz *et al.*, 1998) y pantanos (Devereux *et al.*, 1996a; Rooney-Varga *et al.*, 1997). Por otro lado la diversidad de arqueas metanógenas en ambientes naturales ha sido intensamente estudiada utilizando métodos dependientes de cultivo (Munson *et al.*, 1997; Vetriani *et al.*, 1998; Go *et al.*, 2000; Jurgens *et al.*, 2000; Purdy *et al.*, 2002; Galand *et al.*, 2002) y pocos estudios moleculares se han llevado a cabo para elucidar los cambios de la comunidad de arquea relacionados con la profundidad en sedimentos (Li, J. *et al.*, 1999; Koizumi *et al.*, 2003; Galand *et al.*, 2002)

Purdy *et al.* (2003), investigó la distribución y actividad de SRB y MA en sedimentos de aguas marinas y aguas dulces que se encuentran permanentemente a bajas temperaturas. Encontrando en los sedimentos de aguas dulce un predominio de la comunidad de arquea (34%), donde el 30% de esta señal se relaciona con metanógenas conocidas. Así mismo, en estos sedimentos, la metanogénesis fue el proceso dominante, similar a los resultados encontrados en otros estudios en lagunas de aguas dulces templadas (Namsaraev y Dulov, 1995; Thebrath *et al.*, 1993). Mientras que en los sedimentos de aguas marinas, la metanogénesis representa solo una pequeña proporción (aproximadamente 2%) de todo el flujo de carbono en el sistema, siendo proporcional con la baja proporción de RNA de arquea detectada en estos sedimentos (0.2%). Al contrario la sulfato reducción domina en sedimentos marinos, encontrándose en especial a grupos del género *Desulfotalea* y *Desulforhopalus*, la mayoría de sus miembros son psicófilos, oxidadores incompletos, además utilizan sustratos similares a *Desulfovibrio* (lactato e hidrógeno) (Knoblauch *et al.*, 1999), llegando a concluir que estos grupos son su equivalentes ecológicos en estos hábitats. Por otra parte tanto Purdy *et al.* (2003) y Sahm *et al.* (1999), llegaron a concluir que *Desulfovibrio* en estos ambientes no se reportan como un grupo importante de la comunidad de SRB, contrario a lo observado en sedimentos de temperatura templada (Li *et al.*, 1999; Purdy *et al.*, 2000).

Estudios en sedimentos de aguas dulces determinaron a las SRB como la comunidad mas abundante en capas superficiales, donde la sulfato reducción es relativamente activa (Koizumi *et al.*, 2003). La señal de la sonda DSV 687, es el principal factor del incremento de esta señal, como esta sonda no solo detecta a la familia Desulfovibrionaceae sino también a algunas Geobacteraceae, es necesario evaluar la especificidad de esta sonda o sondas mas especificas y mas selectivas deben desarrollarse en función a la base de datos del 16S rRNA (Koizumi *et al.*, 2003). Por otra parte tanto Koizumi *et al.*, (2003) en sedimentos profundos y Purdy *et al.*, (1999 y 2001) en sedimentos de aguas dulces y estuarios encontraron que las SRB incrementan con la profundidad, donde la concentración de sulfato es 10 veces menor al registrado en el agua intersticial, sugiriendo que estas bacterias pueden sobrevivir con un metabolismo alternativo y coexistir con otras poblaciones microbianas tales como las MA (Sahm *et al.*, 1999).

Bahr y sus colaboradores (2005) determinaron la importancia del grupo de oxidadores completos pertenecientes a las bacterias sulfato reductoras mediante la hibridización del rRNA con sondas especificas que detectaron a toda la familia *Desulfobacteraceae* (sonda 804, Devereux *et al.*, 1992), los filotipos *Desulfosarcina* y *Desulfonema* fueron detectados por Rooney-Varga y colaboradores (1997), además encontró que la hibridización del rRNA con sondas especificas identificaron filotipos dentro de este ensamblaje filogenético que no hibridizan con la sonda 814 comúnmente utilizada para el rRNA del genero *Desulfosarcina* y *Desulfococcus* (Rooney-Varga *et al.*, 1997). Estas observaciones mostraron que el set de sondas utilizadas para la detección de las SRB (Devereux *et al.*, 1992) fallan para la detección de poblaciones dominantes de SRB ya que el diseño de estas sondas no consideran a los nuevos miembros de SRB o aquellos no cultivables reflejando que las SRB son claramente polifileticas (Castro *et al.*, 2000)

#### **2.3.4.1. Limitaciones y problemas del ensayo de hibridización en estudios de la ecología microbiana**

Como cualquier método, el ensayo de hibridización también presenta limitaciones y problemas, por ejemplo; el efecto del muestreo sobre la estructura de la comunidad microbiana (Griffiths *et al.*, 1998; Keith *et al.*, 2005), los efectos de los métodos de

conservación sobre los ácidos nucleicos (Sessitsch *et al.*, 2002; Keith *et al.*, 2005), los propios métodos de extracción de ácidos nucleicos (Menking *et al.*, 1999) y los propios de la hibridización (Ravenschlag *et al.*, 2000). En estudios donde el 16S rRNA debe ser extraído se han encontrado factores críticos que influyen en la recuperación e integridad del mismo en muestras ambientales que pueden ocasionar sesgos en el estudio (Wheeler & Stahl, 2000a), también se han detectado problemas con los métodos de lisis celular fiables y reproducibles de todas las células bacterianas, así como también métodos de extracción intacta de ácidos nucleicos, remoción de sustancias contaminantes como los ácidos húmicos y exopolisacáridos bacterianos los cuales pueden inhibir o introducir sesgos en la detección del RNA en los ensayos de hibridización (Wheeler & Stahl, 2000b). La coextracción de sustancias húmicas y DNA pueden retenerse sobre las membranas de hibridización a través de dos posibles mecanismos: La señal de hibridización puede disminuir por que los ácidos húmicos y el DNA ocupan los sitios de unión sobre la membrana, resultando en una disminución de los sitios de unión para el rRNA (este fenómeno es conocido como saturación de membrana) y las señales de hibridización pueden incrementarse debido a la unión no específica de sondas de oligonucleótidos a los contaminantes unidos sobre la membrana. En segundo lugar, las sustancias húmicas y DNA unidas a la membrana, inmovilizan al rRNA y puede resultar en un incremento de la respuesta de la hibridización debido a la unión no específica de la sonda. Es también posible, sin embargo, que ellos interfieran con la hibridización de la sonda al rRNA, de esta manera la señal de hibridización se reduce. Otro problema propio del método de hibridización está relacionado con la selección de sondas generales y específicas donde se observó que determinadas especies bacterianas no pueden ser detectadas por estas y que podrían contribuir así a la variación de la intensidad de la señal de hibridización (Sahm *et al.*, 1999; Rooney-Varga *et al.*, 1997).

#### **2.4. ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN LA AMAZONIA BOLIVIANA**

La cuenca amazónica de Bolivia representa el 68% de la superficie total del país, con un área de drenaje de 851180 Km<sup>2</sup>, comprende las cuencas de los ríos Mamoré (66.7%) y Beni (33.3%) La cuenca del río Beni, formada por el río Beni se conecta con los ríos Madre de Dios, Orthon, Alto Beni, K'aka, Quiquibey, Tuichi y Madidi, limitada al Sur y al Oeste por los relieves de la Cordillera Oriental de los Andes y al este por el Escudo Brasileño. Esta cuenca se caracteriza por su clima húmedo, sus suelos se encuentran sobre áreas de fuertes

pendientes que están sometidas a procesos de remoción en masa y de alta erosión. El carácter meándrico de estos ríos ocasiona que a su paso formen lagunas de baja profundidad que rápidamente se convierten en lagunas eutróficas y que con el paso del tiempo van perdiendo su vínculo con el río, conectándose ocasionalmente con el mismo durante las inundaciones. Además, los suelos amazónicos representan la fuente principal y reservorio de mercurio para los sistemas acuáticos (Malm *et al.*, 1990; Nriagu *et al.*, 1992; Pfeiffer *et al.*, 1993; Malm *et al.*, 1995; Bourgoin *et al.*, 1999), el cual bajo condiciones favorables puede ser transformado a metilmercurio (potente neurotóxico) en los sedimentos y/o plantas acuáticas (Guimaraes *et al.*, 2000; Roulet *et al.*, 2001) incorporándose en la cadena trófica acuática. Las bacterias sulfato reductoras han sido señaladas como los principales contribuidores biológicos de la metilación en sedimentos (Anderson *et al.*, 1995; King *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000; Blum y Bartha, 1980; Devereux *et al.*, 1996; Gilmour y Henry, 1991; Gilmour *et al.*, 1992; Gilmour *et al.*, 1998), debido a la existencia de una relación cinética entre la sulfato reducción y la metilación del mercurio, proporcionando evidencias de la existencia de un “acoplamiento” entre estos procesos (King *et al.*, 1999). Por otra parte, las arqueas metanógenas (MA) juegan un rol crítico en procesos biogeoquímicos importantes tales como la transformación de compuestos como la demetilación oxidativa del metilmercurio (Oremland *et al.*, 1991). De tal forma que tanto las SRB y MA están involucradas en los procesos de transformación y especiación del mercurio y sus derivados, por lo que su estudio es de vital importancia en la amazonía, zona afectada por la problemática del mercurio.

Por lo tanto, debido a sus condiciones ambientales, tanto a nivel de composición química (elevado contenido en materia orgánica y reservorio de mercurio) como biológica, la amazonía boliviana, formada por sistemas lagunares de aguas dulces, constituye un área importante para el estudio de la comunidad de SRB y MA, que por el elevado contenido orgánico de sus suelos y sedimentos proveería sustratos adecuados (acetato e hidrogeno) para el desarrollo de ambas comunidades, a través de los cuales podrían promoverse procesos de competencia o coexistencia, tal como se demuestra en los trabajos realizados por Purdy y colaboradores (2003) en sedimentos árticos y Koizumi y colaboradores (2003) en lagos oligotróficos (Alm *et al.*, 2000; Glissmann *et al.*, 2004; Go *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2003a; Zepp-Falz *et al.*, 1999). En Bolivia, se han desarrollado proyectos enfocados a la caracterización, estructuración y distribución de bacterias sulfato reductoras en sedimentos

(Luna, 2004; Arteaga, 2004; Sanchez, 2005) y rizósfera de macrófitas de meandros amazónicos (Acha, 2004), los mismos que proporcionaron datos preliminares acerca de la distribución de bacterias sulfato reductoras y de su relación con los procesos de metilación de mercurio, aunque sin considerar, las relaciones que pueden existir entre las comunidades de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanogénicas, considerando que se ha demostrado que los grupos de arqueas metanogénicas son más abundantes que los grupos de bacterias sulfato reductoras en sistemas dulceacuícolas (Purdy *et al.*, 2003; Koizumi *et al.*, 2003).

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1. Objetivo General:

- Determinar la estructura poblacional de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanógenas y su potencial asociación con factores fisicoquímicos y geoquímicos en perfiles sedimentarios de lagunas de aguas blancas y aguas negras de la cuenca amazónica del Río Beni.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar los parámetros fisicoquímicos y geoquímicos del perfil sedimentario de muestreo en la zona litoral (DEM) y central (CEN) de lagunas de aguas blancas y negras en la cuenca amazónica del Río Beni.
- Optimizar métodos independientes de cultivo basados en la hibridación dot-blot para la cuantificación de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanógenas en muestras sedimentarias de meandros lagunares.
- Determinar la distribución, abundancia relativa y dominancia de los dominios (arquea, eucaria y bacteria), así como de los grupos de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanógenas en el perfil sedimentario de muestreo en la zona litoral (DEM) y central (CEN) de lagunas de aguas blancas y negras.
- Establecer posibles asociaciones entre las características fisicoquímicas y geoquímicas y la estructura de comunidades de SRB y MA en el perfil sedimentario de muestreo de lagunas de aguas blancas y negras en la cuenca amazónica del Río Beni.

### 4. HIPÓTESIS:

La distribución y abundancia de dominios y de comunidades de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanógenas, así como las características fisicoquímicas de los perfiles sedimentarios es específico en cada sitio de muestreo, observándose mayor abundancia de SRB y MA en las lagunas con mayor contenido orgánico.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Descripción del lugar de estudio

La zona de estudio estaba conformada por las lagunas La Granja, Río Viejo, Chitiwara y San Gregorio que forman parte de la cuenca del Río Beni (Figura 9), las mismas que se localizan en la región de Rurrenabaque del departamento del Beni (Bolivia), formando parte de la llanura amazónica boliviana. Estas lagunas fueron elegidas por sus características geofísicas, ecológicas y químicas, además de poseer características representativas de la diversidad de esta región (Tabla 2).

La Granja y Río Viejo son lagunas de origen meándrico (forma de frijol) que en época de lluvias entran en contacto directo con las aguas blancas del Río Beni, razón por la cual tienen el mismo tipo de aguas, la misma que proviene casi exclusivamente del drenaje de Los Andes. Debido a su antigüedad estas lagunas poseen diferencias en el grado de eutrofización y una alta diversidad en su fauna y vegetación, sus aguas son turbias y con un elevado contenido de partículas en suspensión. Se puede encontrar macrófitas tales como; *Polygonum densiflorum*, *Eichornia crassipes* y *Scirpus cubensis* en sus alrededores.

Por otro lado, Chitiwara y San Gregorio son lagunas de aguas negras y de origen meándrico y tectónico (tierra firme), respectivamente, estando poco influenciadas por aguas del Río Beni. Por lo general sus aguas provienen exclusivamente del drenaje de la llanura, por lo que sus aguas son ricas en materia orgánica particulada y coloidal. En Chitiwara se observó un elevado grado de eutrofización, con pequeños espacios de agua libre, encontrándose cubierta por una espesa vegetación consistente en macrófitas tales como *Eichornia crassipes*, *Ludwigia helminthorhiza* y *Pistia stratiotes*, razón por la cual es un excelente hábitat tanto para peces, aves y animales propios de esta región. Finalmente, San Gregorio presentó características diferencial respecto a las otras lagunas de estudio, pues sus aguas son transparentes y su sedimento arcilloso, pudiendo encontrarse predominantemente macrófitas tales como *Eichornia crassipes* y *Scirpus cubensis*, las mismas que constituyen un hábitat para peces.

Tabla 2222. Características de las lagunas en estudio en la región de Rurrenabaque

Eliminado: 2

Laguna	Latitud y longitud	Origen	Edad	Tipo de aguas	Grado de eutrofización
La Granja	14°15'48,6"S 67°28'25,3"O	Meandro	>60 años	blancas	Bajo
Río Viejo	14°14'24,9"S 67°27'57,1"O	Meandro	>>60 años	blancas	Medio
Chitiwara	14°18'53,4"S W67°26'34.1"O	Meandro	>>60 años	negras	Alto
San Gregorio	14°14'30"S 67°21'O	Tectónico (tierra firme)	-	negras	Inexistente

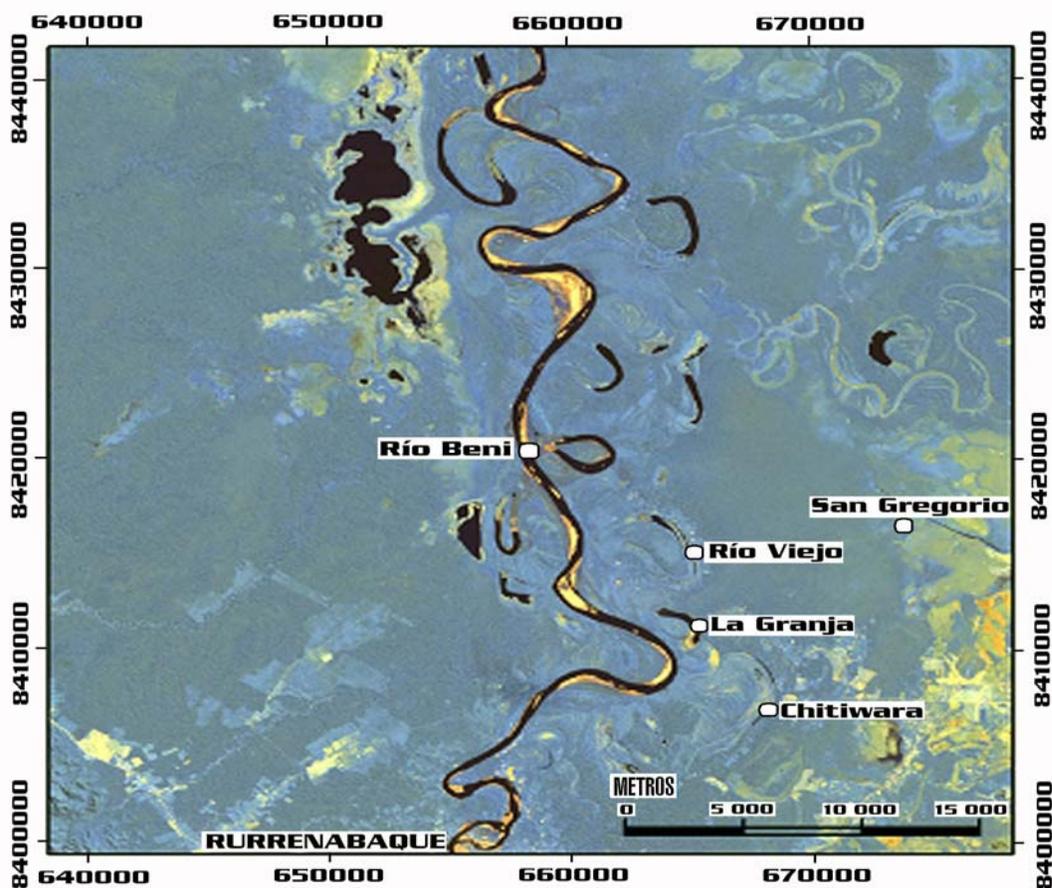


Figura 9999. Mapa del río Beni y de las lagunas estudiadas en la región de Rurrenabaque

Eliminado: 9

## **5.2. Colecta de las muestras**

La colecta se realizó las primeras semanas del mes de mayo del 2005 (final de la época de lluvias, obteniendo perfiles sedimentarios (testigos) de 10 cm de profundidad en un cilindro de policarbonato de 5 cm de diámetro por 30 cm de longitud. Las muestras sedimentarias fueron obtenidas a partir de dos puntos en cada laguna: la zona central, libre de cobertura vegetal, que se denominó punto CEN y la zona debajo de macrófitas (con cobertura vegetal) que se denominó punto DEM. Las características diferenciales de cada punto, así como la profundidad se detallan en la Tabla 3.

A partir de cada perfil sedimentario se obtuvieron sub-muestras por cada centímetro de espesor, realizando la homogenización previa del mismo. Las secciones obtenidas fueron colocadas en recipientes estériles y se conservaron a -20 °C en un congelador portátil Wacco® para el análisis geoquímico correspondiente y a -70 °C en un tanque de nitrógeno líquido para el análisis molecular.

## **5.3. Análisis fisicoquímico y geoquímico**

### **5.3.1. Porcentaje de agua y densidad**

La determinación del porcentaje de agua se realizó a través de la relación existente entre el peso húmedo y seco (liofilizadas) de las muestras seccionadas, mientras que la densidad se obtuvo de la relación del peso seco de la muestra sobre el volumen de agua total presente.

### **5.3.2. Medición de pH y Eh**

Las mediciones de pH (potencial hidrógeno) y Eh (potencial de óxido-reducción) en cada perfil sedimentario fueron realizadas inmediatamente después a la extracción del perfil sedimentario y a intervalos de 1 cm mediante microsondas de platino (Ag/AgCl<sub>2</sub>) con un pHmetro y Ehmetro Consort®, previamente calibrados.

### **5.3.3. Análisis de carbono y nitrógeno orgánico**

Para el análisis de carbono orgánico (C) y nitrógeno orgánico (N) se realizó la acidificación del sedimento liofilizado (aprox. 0,02 mg) con ácido clorhídrico 2 N (tres repeticiones). Las muestras acidificadas fueron posteriormente mediante el detector elemental de Carlo-Erba (Roulet *et al.*, 2000).

### **5.3.4. Concentración y porcentaje de saturación de oxígeno en la columna de agua**

Por otra parte, también se realizó la medición de la concentración de oxígeno disuelto y el porcentaje de saturación de oxígeno en la columna de agua de cada laguna, empleando un oxímetro Consorti®, previamente calibrado (datos compartidos con Arteaga D.)

## **5.4. Análisis molecular**

### **5.4.1. Extracción del 16S rRNA a partir de sedimentos**

La extracción del 16S rRNA se realizó a partir de 16 g (en alícuotas de 4 g) de sedimento en base al método descrito por Fleming y colaboradores (1998), el cual fue modificado en nuestro laboratorio como se describe a continuación, haciendo referencia a éste como método Fleming-CTAB.

A 4 g de sedimento pesados en un tubo de polipropileno de 15 ml, se adicionaron 4 ml de buffer de extracción (100mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.4M de NaCl; 20mM EDTA; 1% SDS; 2% CTAB) previamente calentado a 60°C. La mezcla fue sometida a agitación vigorosa (vortex) durante 3 minutos. Luego se adiciono 2ml de fenol (pH 5.1) y 2 ml de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para luego ser incubado a 60°C durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a agitar vigorosamente (vortex) por 2 minutos, centrifugándose luego a 11000 rpm. El sobrenadante obtenido fue tratado con un volumen igual de cloroformo que se centrifugo nuevamente. El nuevo sobrenadante fue tratado con 0,8 volúmenes de isopropanol y 0,3M concentración final de acetato de sodio, dejando en reposo vertical a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras fueron centrifugadas a

12000 rpm en tubos de 1,5 ml hasta completar todo el volumen. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75% y finalmente las muestras fueron secadas en estufa a 50°C durante 15 minutos. El pellet fue hidratado con 200 µl de agua destilada tratada con DEPC (diethylpirocarbonato) y resuspendido al día siguiente. Las muestras fueron alícuotas y congeladas a – 20 °C para ser utilizadas posteriormente en la hibridación cuantitativa.

#### **5.4.2. Hibridación molecular cuantitativa - Dot-Blot**

El 16S rRNA obtenido fue analizado mediante hibridación por puntos, empleando el kit de hibridación molecular de Amersham Biosciences Biosciences RPN5770 en conjunto con el sistema revelador de Amersham Pharmacia Biotech RPN3510, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del 16S rRNA obtenido, tanto de las muestras como de los controles se realizó utilizando el software de acceso libre por Internet LabImage 2.7.1 ([www.labimage.net](http://www.labimage.net)) empleando un control de concentración conocida (DNA lambda Hind III).

La especificidad para las sondas correspondientes a los dominios de bacteria, arquea y eucaria fueron evaluadas con el 16S rRNA obtenidos de cultivos puros de *Escherichia coli*, *Methanococcus maripaludis* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. De igual manera para el grupo de Arqueas metanogénicas se utilizaron extractos del 16S rRNA de *Methanococcus maripaludis*, *Methanococcus marisnigrii*, *Methanosarcina siciliae*, *Methanospirillum hungatei*, gentilmente proporcionadas por el Dr. William B. Whitman y Magdalena Sieprawska-Lupa (Georgia University, Departamento de Microbiología, USA) y Hinsby Cadillo Quiroz (Cornell University, Departamento de Microbiología, USA). Para las bacterias sulfato reductoras se utilizó amplificadas del 16S rDNA de cultivos de *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfotomaculum nigrificans* y *Desulfobacter lacto*, proporcionados por el Dr. Richard Devereux (EPA-Pensacola, USA).

Aproximadamente 150ng de RNA disuelto en 100 µl de agua tratada con DEPC se desnaturalizaron a 99 °C por 5 minutos y fueron colocados sobre una membrana de nylon “Hybond-N+” (Amersham Pharmacia Biosciences RPN 2020B) previamente tratada utilizando el aparato de microfiltración Bio-Dot® (Bio-Rad). Los blots fueron fijados en

estufa a 80°C por 2 horas. La hibridización se realizó según las instrucciones del fabricante con las temperaturas de hibridización y concentración de sales optimizadas para cada sonda (Tabla 3). Además, una serie de concentraciones conocidas (150, 100, 50, 25 y 10 ng) de control positivo para cada una de las sondas descritas anteriormente, así como un control negativo fueron colocadas adyacentes a las muestras para estimar la cantidad de RNA presente.

La concentración del RNA de todas las muestras, así como las referencias fueron normalizadas con la sonda universal (UNI1390). Para la determinación de la abundancia relativa de cada muestra se tomó en cuenta la sumatoria de las señales de las sondas de los dominios correspondientes a bacteria (EUB338), arquea (ARCH917) y eucaria (EUK1379). Las señales de hibridización obtenidas en las placas fílmicas fueron analizadas utilizando el software de acceso libre por Internet ScionImage 4.0.2. ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com))

**Tabla 3333. Parámetros de las sondas de oligonucleótidos utilizadas para el análisis**

Eliminado: 3

NOMBRE	SECUENCIA	ORGANISMO TARGET *	TEMP. HIB. (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	CONC. SALES
<b>UNI1390</b> <sup>1</sup>	5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA -3'	Todos los organismos	40	44	1x
<b>EUB338</b> <sup>2</sup>	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	Virtualmente todas las bacterias	40	54	1x
<b>ARCH917</b> <sup>3</sup>	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC -3'	Virtualmente todas las arqueas	40	56	1x
<b>EUK1379</b> <sup>4</sup>	5'- TAC AAA GGG CAG GGA C -3'	Eucariotas	T amb.	41	1x
<b>DSV687</b> <sup>5</sup>	5'- TAC GGA TTT CAC TCC T -3'	La mayoría de los Desulfobovibrionaceae y algunos Desulfuromonales	40	41	1x
<b>DCC868</b> <sup>6</sup>	5'- CAG GCG GAT CAC TTA ATG -3'	<i>Desulfosarcina</i> sp., <i>Desulfonema</i> spp., <i>Desulfococcus</i> sp., <i>Desulfobacterium</i> spp., <i>Desulfobotulus</i> sp., <i>Desulfostipes</i> sp., <i>Desulfomusa</i> sp.	40	47	0.5x
<b>DSB623</b> <sup>7</sup>	5'- TGT TTC AAG TGC WCT TCC GGG G -3'	<i>Desulfobacter</i> spp.	40	53	1x
<b>DBB660</b> <sup>8</sup>	5'- GAA TTC CAC TTT CCC CTC TG -3'	<i>Desulfobulbus</i>	40	50	1x
<b>DFM228</b> <sup>9</sup>	5'- GGG ACG CGG AYC CAT -3'	<i>Desulfotomaculum</i> spp.	40	47	1x
<b>MC1109</b> <sup>10</sup>	5'- GCA ACA TAG GGC ACG GGT CT -3'	Methanococcaceae	40	55	1x
<b>MSMX860</b> <sup>11</sup>	5'- GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT -3'	Methanosarcinales (Todas las <i>Methanosarcina</i> y <i>Methanosaeta</i> )	40	57	1x
<b>MG1200</b> <sup>12</sup>	5'- CGG ATA ATT CGG GGC ATG CTG -3'	<i>Methanomicrobium</i> spp., <i>Methanogenium</i> spp., <i>Methanoculleus</i> spp., <i>Methanospirillum</i> spp., <i>Methanocorpusculum</i> spp., <i>Methanoplanus</i> spp.	40	53	1x

\*Datos obtenidos en "probeBase an online resource for r-RNA target for oligonucleotide probes" ([www.microbial-ecology.net](http://www.microbial-ecology.net))

<sup>1,2,3,4</sup> MacGregor *et al.*, 2001

<sup>5,6,7,8,9</sup> Daly *et al.*, 2000.

<sup>3,10,11,12</sup> Raskin *et al.*, 1996.

### **6.2.3. Cuantificación de la señal de hibridización**

Para este propósito se realizó la evaluación de la intensidad luminosa captada por la placa filmica mediante el software ScionImage, realizando dos tipos de análisis, el primero concerniente al valor máximo (pico) y otro a la media (promedio) de la intensidad luminosa. Estos dos parámetros fueron evaluados aplicando el estadístico Pearson (Anexo 1) en función a una serie de concentraciones del rRNA de referencia (150, 100, 50, 25 y 10ng/ul) colocadas para cada sonda, indicando que la señal obtenida por el valor medio reflejó la mejor correlación ( $r = 0,9$ ), ajustándose al background de la placa filmica. Por lo tanto, los análisis cuantitativos de la intensidad luminosa de las muestras fueron realizados en función a la media aplicando regresión lineal.

## **5.5. Análisis Estadístico**

### **5.5.1. Validación de las membranas de hibridación**

La intensidad luminosa emitida por las membranas de hibridación fue captada sobre una placa filmica, en la cual se realizó la evaluación de los valores promedio y picos máximos de la intensidad de luz para cada una de las muestras analizadas mediante el índice de correlación, "R", lo que permitió identificar el valor que mejor se ajusta a las propiedades de cada una de las placas, validando de esta forma las condiciones inherentes a la placa filmica (donde el background de la placa, la señal mínima y máxima detectable deben correlacionarse).

### **5.5.2. Análisis cuantitativo**

La serie de concentraciones del rRNA de referencia (150, 100, 50, 25 y 10ng de RNA/ul) aplicadas en cada membrana, permitió realizar el análisis cuantitativo de todas las muestras empleando el modelo de regresión lineal a través de la siguiente fórmula:

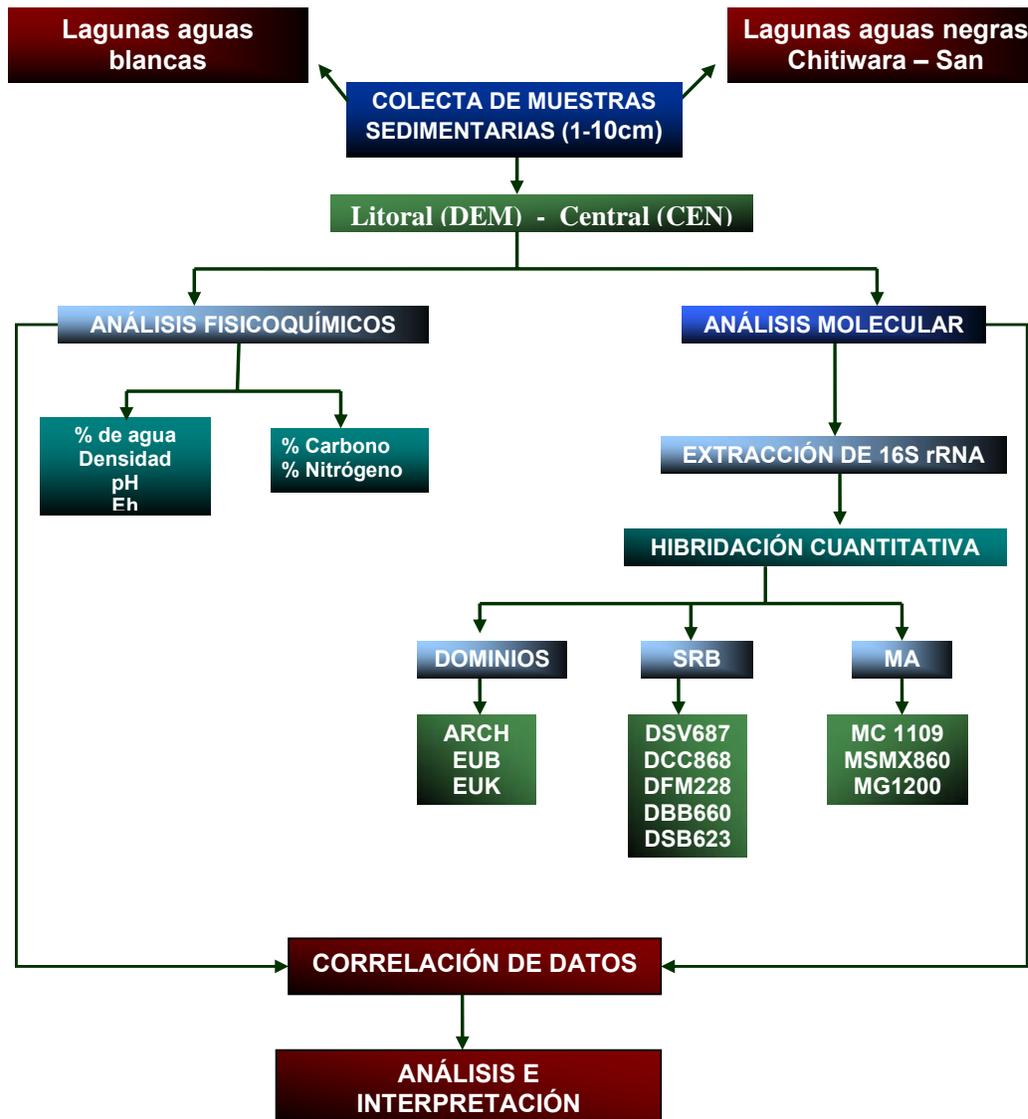
$$y = b + mx \quad (1)$$

Donde:  $y$ , representa la intensidad de luz en pixeles,  
 $x$ , es la concentración de rRNA total en ng/ $\mu$ l,  
 $m$ , es la pendiente  
 $y$   $b$ , es la histéresis.

Realizando un ajuste en esta fórmula, podemos determinar la concentración de rRNA total para cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$x_n = (y - b)/m \quad (2)$$

Los datos obtenidos fueron referidos en términos de abundancia relativa de cada grupo en función a la combinación de las señales de bacteria (EUB338), arquea (ARCH917) y eucaria (EUK1379), denominada como UNI ajustada.

**Diseño Experimental**

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características generales de los perfiles sedimentarios

En general, los perfiles sedimentarios de los meandros lagunares mostraron características influenciadas por el lugar de la colecta tanto en las lagunas de aguas claras (La Granja y Río Viejo) como en las lagunas de aguas negras (Chitiwara y San Gregorio). Los estratos sedimentarios extraídos del sitio de muestreo centro (CEN) y del sitio de muestreo por debajo de las macrófitas (DEM) mostraron superficies levemente irregulares en la interfase agua-sedimento y una fase acuosa enturbada por suspensión de partículas del sedimento debido a la colecta manual de los mismos. El cilindro extraído en DEM se encontró cubierto por una densa capa de raíces perteneciente a la comunidad de macrófitas propia de cada laguna. Se observaron diferencias tanto en la localización, profundidad, color, textura y estructura granular del sedimento (tabla 4).

Los perfiles sedimentarios extraídos de las **lagunas de aguas blancas** mostraron las siguientes características; en el sitio CEN de La Granja el perfil mostró un color marrón claro y una zona de color amarillo a los 4 cm. de profundidad, de textura granular lodosa. El sitio DEM mostró un color marrón uniforme, de textura mucho más lodosa y menos granular. En Río Viejo el sitio CEN mostró un color marrón negrusco a lo largo de todo el perfil, de textura granular lodosa. El sitio DEM mostró un color marrón oscuro, textura más lodosa y menos granular y presencia de materia vegetal en la interfase agua-sedimento. En **las lagunas de aguas negras**; Chitiwara presentó un alto grado de eutrofización, por lo que la muestra del sitio CEN se colectó de una pequeña porción de agua libre, el perfil mostró un color negruzco, textura lodosa parecida al lodo de pantano. El sitio DEM presentó un color negruzco, textura gredosa muy compacta con materia orgánica depositada sobre los primeros centímetros del perfil. En San Gregorio el sitio CEN mostró un color marrón claro, textura inconsistente, arcillosa y poco lodosa. El sitio DEM, presentó un color marrón y se observó claramente la presencia de una fase orgánica y vegetal hasta los 5 cm. de profundidad y un sedimento mucho más compacto y arenoso al incrementar la profundidad.

Tabla ~~444~~. Características generales de los estratos sedimentarios colectados de las lagunas en estudio

Eliminado: 4

Laguna	Profundidad aproximada	Color – Textura	Observaciones
<b>La Granja</b>			
CEN	1.80 m	Marrón-lodoso	Zona de color amarillo a los 4 cm
DEM	1.20 m	Marrón-lodoso	
<b>Río Viejo</b>			
CEN	2.60 m	Marrón negrusco-lodoso	Materia vegetal en descomposición depositada en los primeros centímetros del perfil
DEM	2.20 m	Marrón lodoso	
<b>Chitiwara</b>			
CEN	2.60 m	Marrón-lodoso	Elevada eutrofización en casi toda la laguna
DEM	2.40 m	Negrusco-gredoso	Colecta del sedimento de una pequeña área de porción de agua libre
<b>San Gregorio</b>			
CEN	1.80 m	Marrón-arcilloso inconsistente	Sedimento con elevada cantidad de agua
DEM	30 cm	Marrón-arcilloso compacto	Zona vegetal y orgánica diferenciadas a los 5 cm de profundidad

## 6.2. Propiedades fisicoquímicas y geoquímicas de los perfiles sedimentarios

### 6.2.1. Porcentaje de agua y densidad

El porcentaje de agua y densidad medidos a lo largo del perfil sedimentario reflejan la textura y compactación de los sedimentos. En general, todos los perfiles sedimentarios mostraron una disminución en el contenido de agua y un aumento de la densidad con el incremento de la profundidad del perfil (Anexo 1). El porcentaje promedio de agua fue mayor al 50% en todos los perfiles sedimentarios a excepción del perfil sedimentario del sitio DEM (45%) de la laguna San Gregorio (laguna de agua negra).

#### **a. Lagunas de aguas claras**

Si bien los perfiles sedimentarios de ambas lagunas mostraron tendencias similares (Gráfica 1A y 1B). En La Granja tanto en el sitio CEN como en DEM el porcentaje de agua mostró valores promedio del 51% y 57%, respectivamente ( $r = 0.64$ ). Mientras que en Río Viejo se reportaron valores del 64% para CEN y 70% para DEM ( $r = 0.90$ ). Observándose en el sitio DEM valores relativamente mayores de contenido de agua y menor densidad respecto al sitio CEN (Anexo 1).

#### **b. Lagunas de aguas negras**

En Chitiwara tanto en CEN como DEM el contenido de agua disminuyo a lo largo del perfil con un valor promedio del 58% y del 51%, respectivamente ( $r = 0.66$ ). En San Gregorio, el sitio CEN presentó una disminución leve a lo largo de todo el perfil con un valor promedio del 94%, contrario a lo observado en el sitio DEM donde el contenido de agua decrece drásticamente con la profundidad con un valor promedio del 45% ( $r = 0.78$ ). Es así que San Gregorio (CEN) presentó características particulares, ya que presentó el mayor contenido de agua y el sitio DEM el menor contenido de agua con relación a las otras lagunas (Gráfica 2A y 2B). Por otra parte, tanto Chitiwara como San Gregorio mostraron en el sitio CEN mayor porcentaje de agua y menor densidad que en el sitio DEM, contrario a lo observado en las lagunas de aguas blancas. (Anexo 1)

#### **6.2.2. pH y potencial oxido-reductor**

El rango de pH en las lagunas analizadas se encontró entre 5.8 a 7.2. Observándose en el sitio DEM valores de pH ligeramente menores comparados con los del sitio CEN (Anexo 1)

El potencial de oxido reducción, en la mayoría de los puntos de muestreo presenta un carácter reductor, a excepción del sitio CEN en La Granja y el sitio DEM en San Gregorio, donde se observo de manera general un Eh oxidativo (Gráficas 1 y 2). Por otra parte el Eh

en las lagunas de aguas negras tiende a ser ligeramente reductorio a oxidativo mientras que en las lagunas de aguas blancas este es más reductorio.

#### **a. Lagunas de aguas blancas**

En La Granja los perfiles del sitio CEN y DEM mostraron valores promedio de pH de 7.3 (7-8) y 6.7 (6.8-6.6), respectivamente ( $r = 0.28$ ). Mientras que en Río Viejo se encuentran entre 6.8 (6.6-7) para CEN y 6.4 (6.3-6.6) para DEM ( $r = 0.18$ ). Observándose que los valores de promedio de pH en CEN son un poco mas elevados comparados con el sitio DEM (Anexo 1). Además, cabe destacar la fluctuación observada en el sitio CEN de La Granja entre los 4 y 7 cm de profundidad donde se registró un pH 8, levemente alcalino con relación a las demás lagunas (Gráfica 1B).

Por otra parte, los valores de Eh en los sitios de muestreo CEN y DEM en ambas lagunas mostraron un carácter reductor (con valores promedio de -129 mV en el sitio DEM de La Granja; -105 mV y -112 mV en el sitio CEN y DEM, respectivamente en Río Viejo), a excepción del sitio CEN en La Granja que reflejo un ambiente oxidativo 144 mV (111mV a 177 mV). Sin embargo, el sitio DEM mostró un Eh más reductorio que CEN. Además, el Eh de estas lagunas tiende a ser más reductorio que el observado en las lagunas de aguas negras (Gráfica 1) (Anexo 1)

#### **b. Lagunas de aguas negras**

En general los valores de pH para estas lagunas son ligeramente más bajos que los de las lagunas de aguas blancas. En Chitiwara el perfil de pH en el sitio CEN y DEM mostraron valores promedio de 6.6 y 6.4, respectivamente ( $r = 0.22$ ). Mientras que en San Gregorio los valores de pH se encontraron entre 6.8 para CEN y 5.9 para DEM ( $r = - 0.33$ ), siendo este último donde se registró el menor pH (ligeramente ácido) entre todas las lagunas. Los valores encontrados en el sitio CEN resultaron ser algo mas elevados a los valores promedio del sitio DEM (Anexo 2).

Los valores de Eh en estas lagunas sugieren que el sitio CEN presenta Eh más reductivos que DEM, contrario a lo observado en las lagunas de aguas blancas. Observándose el

siguiente orden Chitiwara (CEN) presenta el Eh mas reductor (-142mV), seguido por Chitiwara (DEM) (-73 mV) y San Gregorio (CEN) (-92 mV) que presentaron un Eh ligeramente reductor mostrando una tendencia oxidativa mientras que San Gregorio (DEM) constituye un caso particular ya que el perfil de Eh reflejo un carácter oxidativo (valor promedio 68mV) muy diferente al encontrado en el sitio CEN de esta laguna (Gráfica 2B).

### **6.2.3. Porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno**

Los porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno reflejan el contenido de materia orgánica de las lagunas. En general, tanto el porcentaje de carbono orgánico como el de nitrógeno decrecen con la profundidad en todos los perfiles sedimentarios. El contenido de carbono y nitrógeno entre las lagunas de aguas blancas y negras mostraron diferencias significativas ( $r = 0.33$  para %C y  $r = 0.29$  para %N) (Anexo 2) con valores porcentuales de carbono y nitrógeno de 1.95% y 0.19%, respectivamente para las lagunas de aguas blancas y de 6.06% y 0.68%, respectivamente para las lagunas de aguas negras (Anexo 1) (Gráfica 1 y 2).

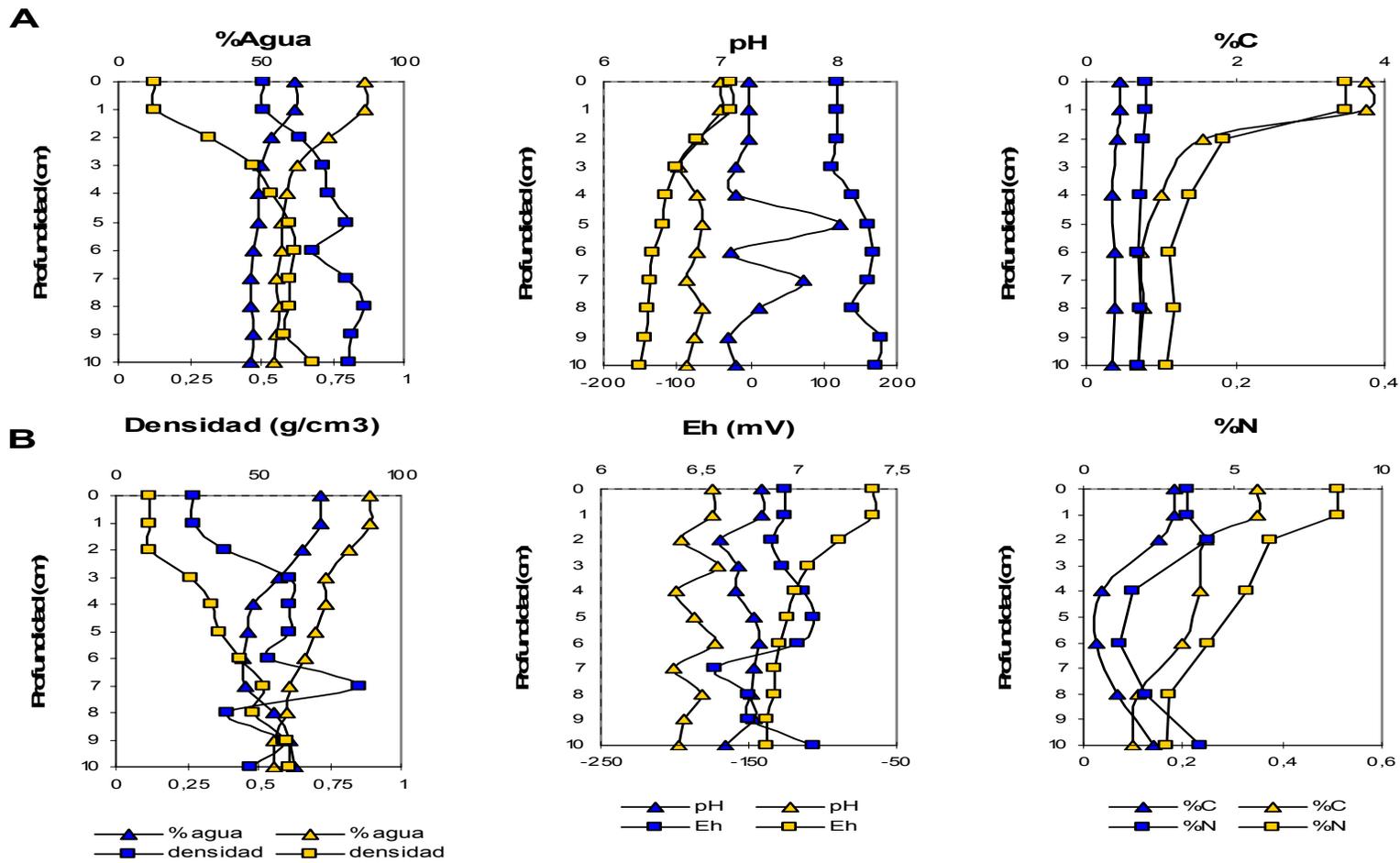
#### **a. Lagunas de aguas blancas**

Tanto en el sitio CEN como en DEM se observo que el contenido orgánico de estas lagunas es relativamente bajo comparado con los encontrados en las lagunas de aguas negras con valores que oscilan entre 0.39% a 3.7% de carbono y 0.07% a 0.33% de nitrógeno, siendo los valores encontrados en el punto CEN de La Granja (0.33% a 0.43% de carbono y 0.069% a 0.078% de nitrógeno) los más bajos en comparación con las otras lagunas (Gráfica 1A) (Anexo 1). Además, tanto en el sitio CEN como en DEM se registraron valores máximos de carbono orgánico y nitrógeno en los dos primeros centímetros del perfil para ambas lagunas, asimismo, el sitio DEM presento valores de hasta 3 a 7 veces superiores en concentración de nitrógeno y carbono orgánico en comparación con el sitio CEN de La Granja y 1.5 veces en comparación con el sitio CEN de Río Viejo (Gráfica 1A y 1B).

#### **b. Lagunas de aguas negras**

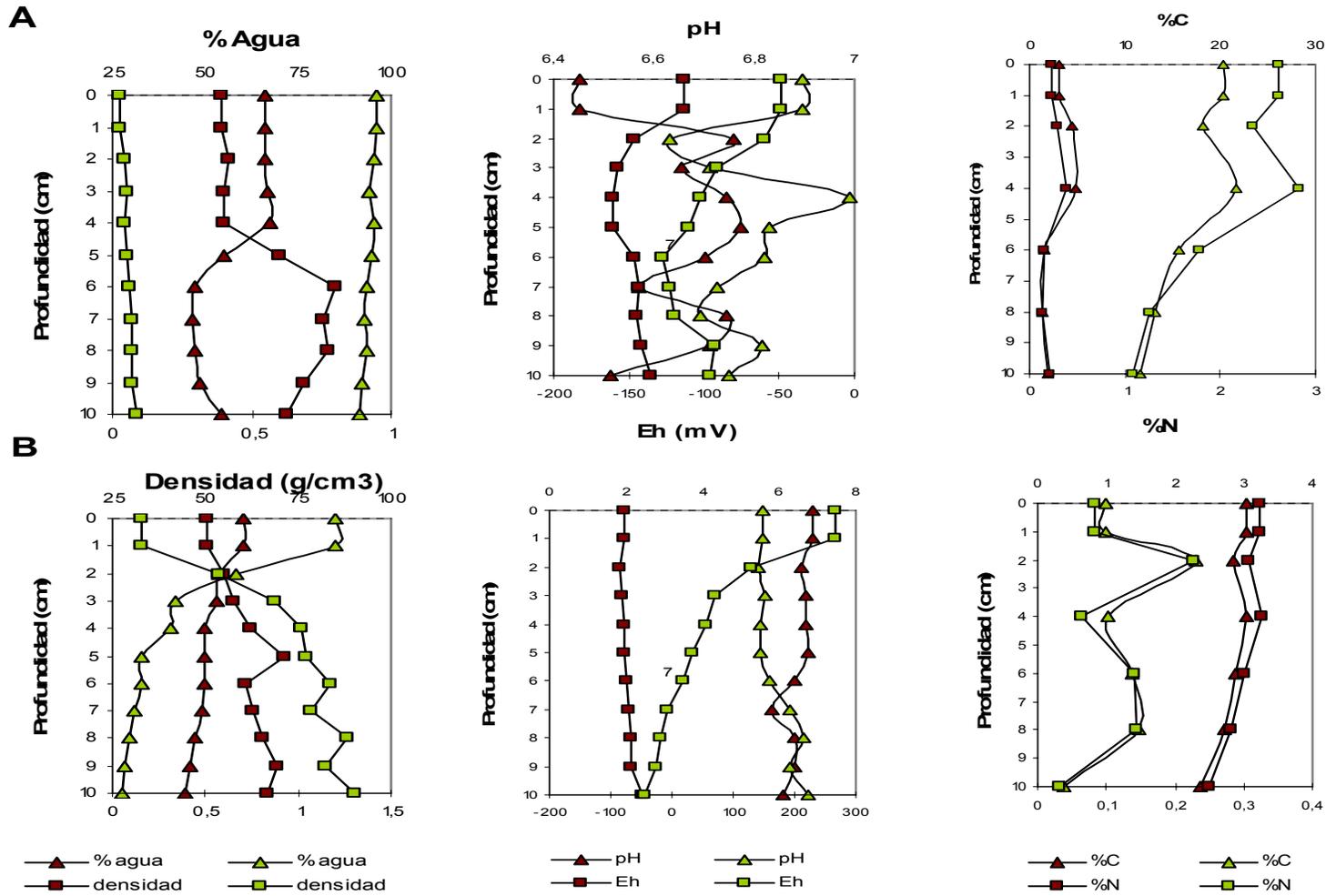
Estas lagunas presentaron valores que varían entre 1.2% a 17.2% de carbono y entre 0.1% a 2% de nitrógeno, resultando ser mas altos comparado que los encontrados en las lagunas

de aguas blancas (Anexo 1), siendo el perfil sedimentario del sitio CEN de San Gregorio el que presenta valores porcentuales de carbono (17%) y nitrógeno (2%) superiores de hasta 8 a 3 veces, respectivamente, comparado con los valores reportados en las lagunas de aguas blancas. Así mismo, se observó que los valores porcentuales de carbono y nitrógeno del sitio CEN resultan ser mas elevados que los observados en DEM, contrario a lo reportado en las lagunas de aguas blancas, destacándose el perfil del sitio CEN de San Gregorio que presento valores hasta 14 y 20 veces superior de carbono y nitrógeno, respectivamente, comparado con los valores reportados en el punto DEM (Gráfica 2A y 2B).



Gráfica 1111. Características fisicoquímicas y geoquímicas de los perfiles sedimentarios de La Granja (símbolo azul) y Río Viejo (símbolo amarillo) A, punto de muestreo CEN; B, punto de muestreo DEM.

Eliminado: 1



Gráfica 2222. Características fisicoquímicas y geoquímicas de los perfiles sedimentarios de Chitiwara (guindo) y San Gregorio (verde)

Eliminado: 2

**A, punto de muestreo CEN; B, punto de muestreo DEM.**

### 6.2.3.1. Razón C/N

La razón carbono/nitrógeno es utilizada para resaltar la calidad de sustrato (materia orgánica) disponible y la influencia del entorno sobre los sedimentos (Ingall y van Cappelen, 1990; Middel-burg *et al.*, 1996; Raimbault *et al.*, 1999; Köster y Meyer-Reil, 2001; Helland *et al.*, 2003), ya que los procesos de mineralización microbiana se ven influenciadas por las mismas. En este estudio, se observó que las lagunas de aguas blancas La Granja y Río Viejo presentan una razón C/N mayor en el sitio DEM respecto a CEN ( $r = 0.47$  y  $r = 0.06$ , respectivamente). Mientras que en las lagunas de aguas negras esta se presenta variable, observándose la razón C/N más elevada en el sitio CEN de Chitiwara y DEM de San Gregorio en relación a los otros dos sitios de muestreo en ambas lagunas (Tabla 5) (Anexo 1). En general, se observó que el sitio CEN en todas las lagunas presentó mayores diferencias que en DEM.

Tabla 5555. Razón C/N en las cuatro lagunas estudiadas

Eliminado: 5

C/N	La Granja	Río Viejo	Chitiwara	San Gregorio
Sitio CEN	5,22	7,66	11,87	8,86
Sitio DEM	9,31	11,25	9,46	11,60

### 6.2.4. Concentración y porcentaje de saturación de oxígeno en la columna de agua

La medición de estos parámetros en la columna de agua, permite establecer las características óxicas de estas lagunas. Así, tanto las lagunas de aguas blancas y negras se caracterizan por presentar características subóxicas, a excepción de San Gregorio que mostró un carácter óxico (Tabla 6).

Tabla 6666. Concentración de oxígeno disuelto (mg/L) y porcentaje de saturación de O<sub>2</sub> en la columna de agua de las lagunas estudiadas

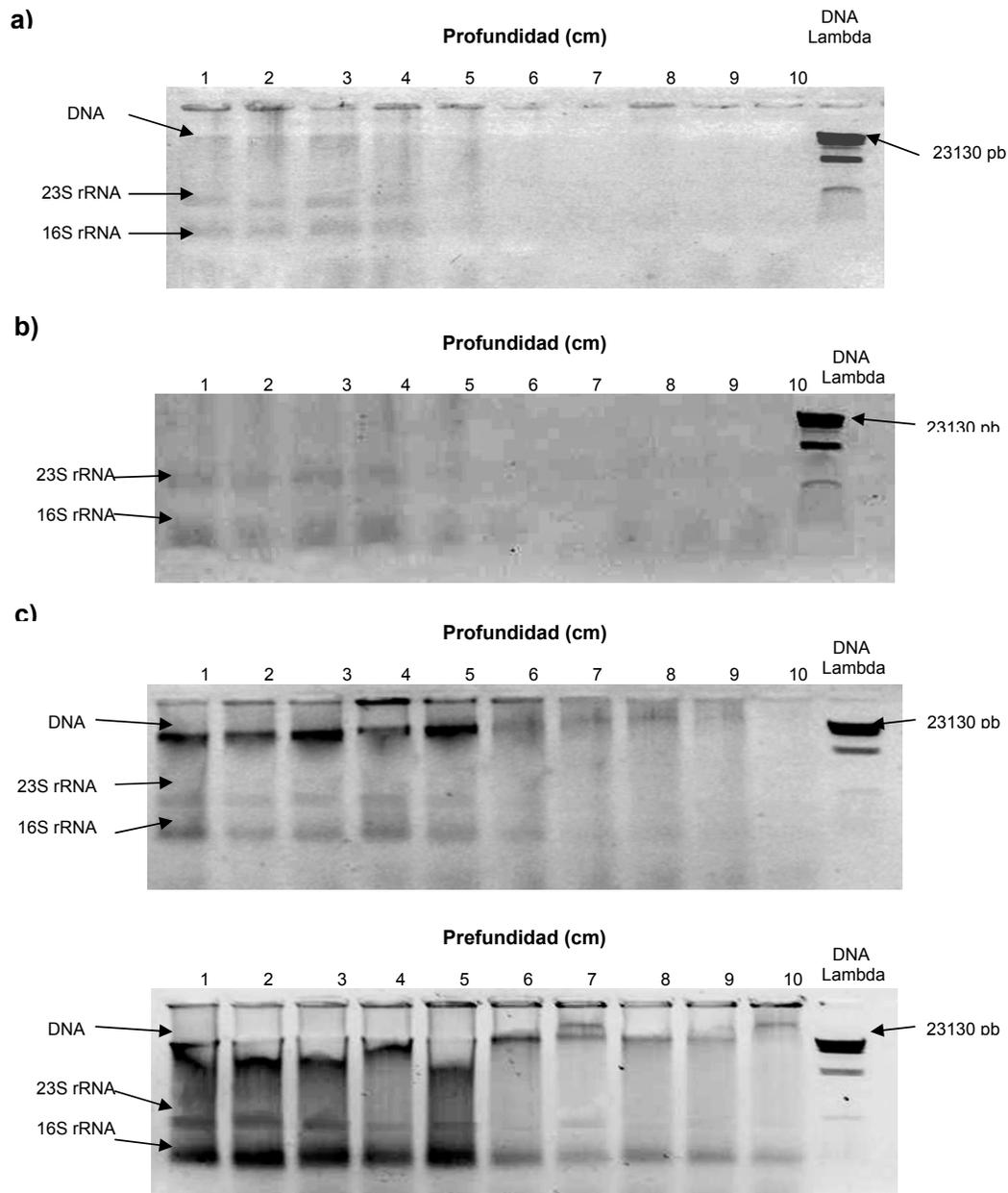
Eliminado: 6

Laguna	(mg O <sub>2</sub> /L)	% Saturación de O <sub>2</sub>	Categoría
La Granja	2,53	17,45	Suboxico (0.1 – 6 mgO <sub>2</sub> /L)
Río Viejo	1,31	37,5	Suboxico (0.1 – 6 mgO <sub>2</sub> /L)
Chitiwara	0,35	2,03	Suboxico (0.1 – 6 mgO <sub>2</sub> /L)
San Gregorio	6,90	83,67	Óxico (6 – 12 mgO <sub>2</sub> /L)

### **6.3. Extracción de RNA a partir de muestras sedimentarias**

Los extractos de RNA obtenidos de las lagunas de aguas blancas (La Granja y Río Viejo) presentaron una coloración marrón-clara, mientras que los extractos de las lagunas de aguas negras (Chitiwara y San Gregorio) presentaron un color marrón-negruzco, probablemente a causa de la coextracción de ácidos húmicos y fúlvicos.

En La Granja y Río Viejo las bandas correspondientes al 16S y 23S rRNA fueron levemente visibles, la cantidad de RNA extraído se encontró aproximadamente entre 0.5 a 0.1 ug de RNA/g de sedimento, mientras que la cantidad asignada al fragmento 16S rRNA fue <0.1 ug de RNA. Chitiwara y San Gregorio mostraron bandas bien definidas (Figura 10), obteniéndose valores que se encuentra entre un rango de 4 – 12 ug de RNA/g de sedimento, mientras que la cantidad asignada al fragmento 16S rRNA se encontró entre 0.5 – 5 ug de 16S rRNA.



**Figura 10101010:** Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de extractos del 16S rRNA, obtenidos mediante el método Fleming-CTAB. a) Citiwara punto CEN, b) Citiwara punto DEM, c) San Gregorio punto CEN y d) San Gregorio punto DEM.

Eliminado: 10

#### **6.4. Detección y cuantificación de la estructura poblacional mediante hibridización molecular.**

##### **6.4.1. Perfil vertical de la composición de dominios**

En general los dominios de eucaria (EUK) y arquea (ARCH) mostraron ser los más abundante en todas las lagunas, seguidos de bacteria (EUB). Siendo arquea el más abundante en el sitio DEM. Cada laguna y cada sitio de muestreo (CEN y DEM) presento características específicas sobre la distribución de los dominios a lo largo del perfil en profundidad (Gráfica 3).

##### **a. Lagunas de aguas blancas**

En La Granja (CEN), EUK se presento como el dominio más abundante hasta los 6 cm (50%) distinguiéndose luego ARCH hasta los 10 cm de profundidad (47%). Mientras que en La Granja (DEM) ARCH fue el dominio mas abundante en los dos primeros y últimos centímetros de profundidad (44% y 49%, respectivamente), distinguiéndose luego a EUK entre los 3 a 8 cm (47%). Un patrón contrario se registró en Río Viejo (CEN), encontrándose a ARCH como el dominio más abundante hasta los 4 cm (43%), observándose luego a EUK hasta los 10 cm de profundidad (48%) (Grafica 3A). En Río Viejo (DEM), se observó tanto a ARCH y EUK que alternaron en abundancia hasta los 6 cm de profundidad, sin registrarse grandes variaciones entre ambos dominios, mientras que a mayor profundidad (7 a 10 cm), ARCH fue el domino mas abundante (72%) (Gráfica 3B).

Por otra parte, EUB tanto en el sitio CEN y DEM mostró ser el dominio menos abundante en ambas lagunas con un valor promedio del 15% (7% a 23%), mostrando un perfil relativamente homogéneo diferente a los otros dominios (EUK y ARCH) que presentaron mayor variación y fluctuación a lo largo del perfil.

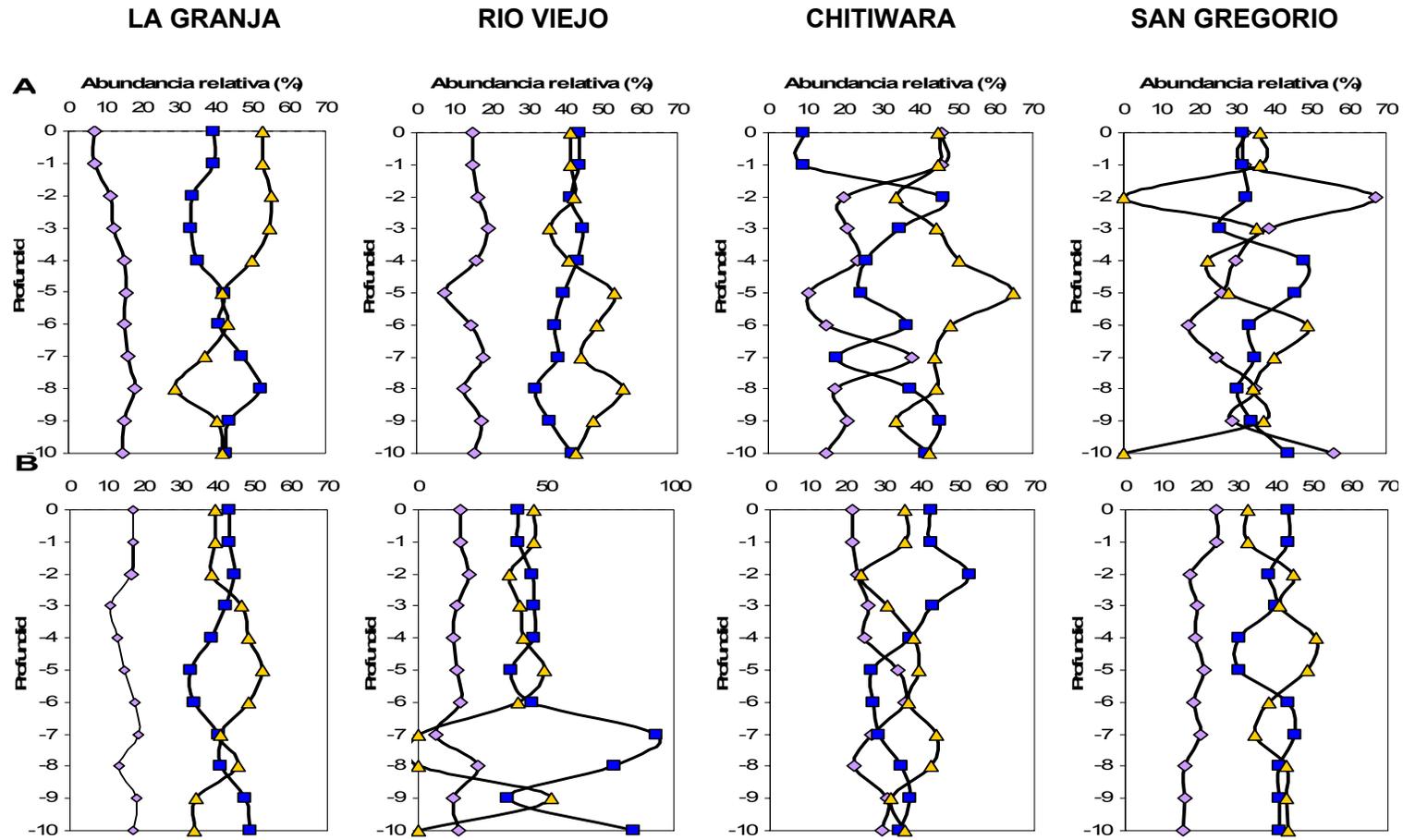
También cabe mencionar que los valores máximos de abundancia de cada dominio se encuentran en puntos totalmente diferentes entre lagunas y sitios de muestreo. Así, La Granja (CEN) presentó valores máximos de EUB y ARCH a los 8 cm (18% y 52%) y EUK en las capas superiores de 0 – 4 cm de profundidad (53%). En La Granja (DEM) presentó un valor máximo a los 7 cm (19%) para EUB, ARCH a los 10 cm (49%) y EUK a los 5 cm (52%).

Mientras que en Río Viejo (CEN) EUB y ARCH presentaron valores máximos a los 3 cm (19% y 45%) y EUK a los 5 cm y 8 cm (55%), una distribución similar se encontró en Río Viejo (DEM) que presentó un valor máximo a los 8 cm (23%), ARCH a los 7 cm (93%) y EUK a 9 cm (52%), hallándose ausente a los 7, 8 y 10 cm de profundidad (Gráfica 3A y 3B).

#### **b. Lagunas de aguas negras**

En Chitiwara (CEN), EUB fue el dominio más abundante en el primer centímetro (46%), seguido de ARCH a los 2 cm (45%) y entre los 9 a 10 cm de profundidad (43%) y EUK entre los 3 a 8 cm (50%). En cambio Chitiwara (DEM) mostró mayor abundancia de ARCH en los primeros tres centímetros (46%) y luego la distribución y abundancia de los otros dominios se mostró variable con la profundidad (Gráfica 3B). Mientras que en San Gregorio (CEN) tanto la distribución como la abundancia de los dominios se encontró muy variable a lo largo del perfil, destacándose como los más abundantes ARCH y EUK (36%) (Gráfica 3A). En San Gregorio (DEM) los dominios mas abundantes fueron ARCH (39%) y EUK (42%) con valores alternantes a lo largo de todo el perfil, mientras EUB mostró ser el dominio menos abundante (19%) y de distribución relativamente homogénea a lo largo del perfil (Gráfica 3B).

En Chitiwara (CEN), los valores máximos de abundancia de EUB se registraron en el primer centímetro (46%), ARCH a los 2 cm (46%) y EUK a los 5 cm (65%) mientras que en Chitiwara (DEM), EUB presento valores máximos a los 6 cm (36%), ARCH a los 2 cm (53%) y EUK entre los 7 a 8 cm (44%). En San Gregorio (CEN), EUB presentó un valor máximo a los 2 cm (67%), ARCH a los 4 cm (48%) y EUK a los 6 cm (49%), hallándose ausente a los 2 y 10 cm de profundidad. En San Gregorio (DEM), EUB mostró un valor máximo al primer centímetro de profundidad (24%), ARCH a los 7 cm (45%) y EUK a los 4 cm (51%) (Gráfica 3A y 3B)



Gráfica 3333. Estructura vertical de la abundancia relativa de bacteria (■), arquea (■), y eucaria (■).  
 A, punto de muestreo CEN; B, punto de muestreo DEM.

Eliminado: 3

#### 6.4.2. Distribución y abundancia de las comunidades microbianas de SRB y MA

La distribución de las comunidades microbianas de SRB y MA fue evaluada en función de su abundancia en el perfil en profundidad. Cada laguna en cada sitio de muestreo (CEN y DEM) presentó una distribución característica de las comunidades microbianas de SRB y MA a lo largo del perfil. La determinación de la abundancia relativa de los grupos de SRB y MA se realizó en base al 100% de la señal establecida por eucaria, arquea y bacteria (UNI ajustada) en cada sitio y laguna en estudio.

##### a. Lagunas de aguas blancas

###### Comunidad de SRB

En La Granja (CEN) se observó mayor abundancia de los sub-grupos de SRB en los primeros centímetros de profundidad (entre 1 a 4 cm), destacándose a *Desulfobulbus* (DBB) (33%) como el más abundante seguido de *Desulfotomaculum* (DFM) (27%) (Gráfica 4A). La Granja (DEM) mostró mayor abundancia de los sub-grupos de SRB en la sección intermedia del perfil sedimentario (entre los 3 a 7 cm) con preponderancia de DBB (28%), seguido de DFM (24%), mientras que en las capas superficiales y profundas del perfil se observó mayor abundancia de DFM. En Río Viejo (CEN) la distribución de todos los sub-grupos de SRB fue similar a lo largo de todo el perfil (Gráfica 4A) (Gráfica 4A). En Río Viejo (DEM) a los 7 cm de profundidad DFM se encontró con preponderancia (50%) hallándose ausentes los otros sub-grupos (DBB, DSB, DCC y DSV). Por otra parte, se observó mayor abundancia de los sub-grupos de SRB en las capas más profundas del perfil (entre los 8 a 10 cm) con preponderancia de DBB (81%) (Gráfica 4)

###### Comunidad de MA

En cuanto a los grupos de MA, en La Granja tanto en el sitio CEN como en DEM se observó una distribución semejante de todos los grupos a lo largo del perfil (Gráfica 5). En Río Viejo (CEN) la distribución de todos los grupos de MA fue relativamente similar a lo largo del perfil, a excepción de MSMX que se presentó como el grupo más abundante (31%) entre los 5 a 10 cm de profundidad (Gráfica 5A). En Río Viejo (DEM) se observó mayor abundancia de

todos los grupos de MA en las capas profundas del perfil (8 a 10 cm) destacándose MSMX (38%) como el mas abundante. No obstante, cabe señalar que todos los grupos de MA se hallaron ausentes a los 7 cm de profundidad, al igual que para la mayoría de las SRB en este sitio de muestreo (Gráfica 5B).

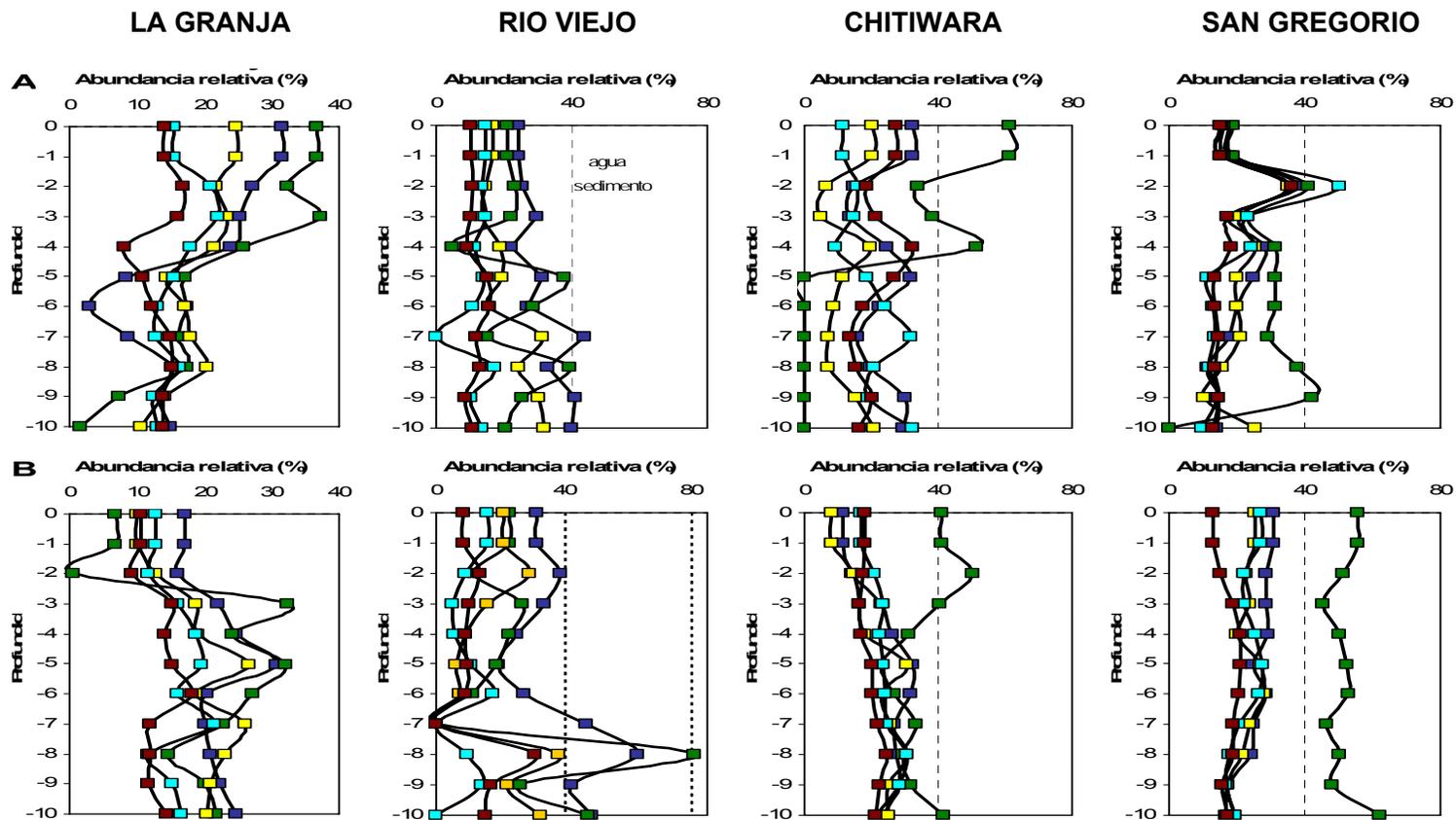
#### **a. Lagunas de aguas negras**

##### **Comunidad de SRB**

En Chitiwara (CEN) se observo mayor abundancia de DBB (46%) entre los primeros 4 cm del perfil, hallándose ausente entre los 5 a 10 cm, la distribución y abundancia de los otros grupos de SRB fue relativamente similar a lo largo del perfil. En Chitiwara (DEM) se observo que todos los sub-grupos de SRB se presentaron a lo largo del perfil con características similares en cuanto a su distribución y abundancia, a excepción de DBB el cual resulto ser el mas abundante entre los primeros cuatro centímetros de profundidad (41%) (Gráfica 4B). En San Gregorio (CEN), se observa un patrón muy similar de todos los sub-grupos de SRB hasta los 3 cm de profundidad, de los cuales DBB mostró ser el grupo mas abundante (29%). A los 2 cm de profundidad se observó abundancia de todos los grupos de SRB, destacándose a DCC (50%) como el más abundante (Gráfica 4A). San Gregorio (DEM) mostró una tendencia similar en cuanto a su distribución y abundancia a la observada en Chitiwara (DEM), no obstante DBB resulto ser más abundante a lo largo de todo el perfil (51%) (Gráfica 4B).

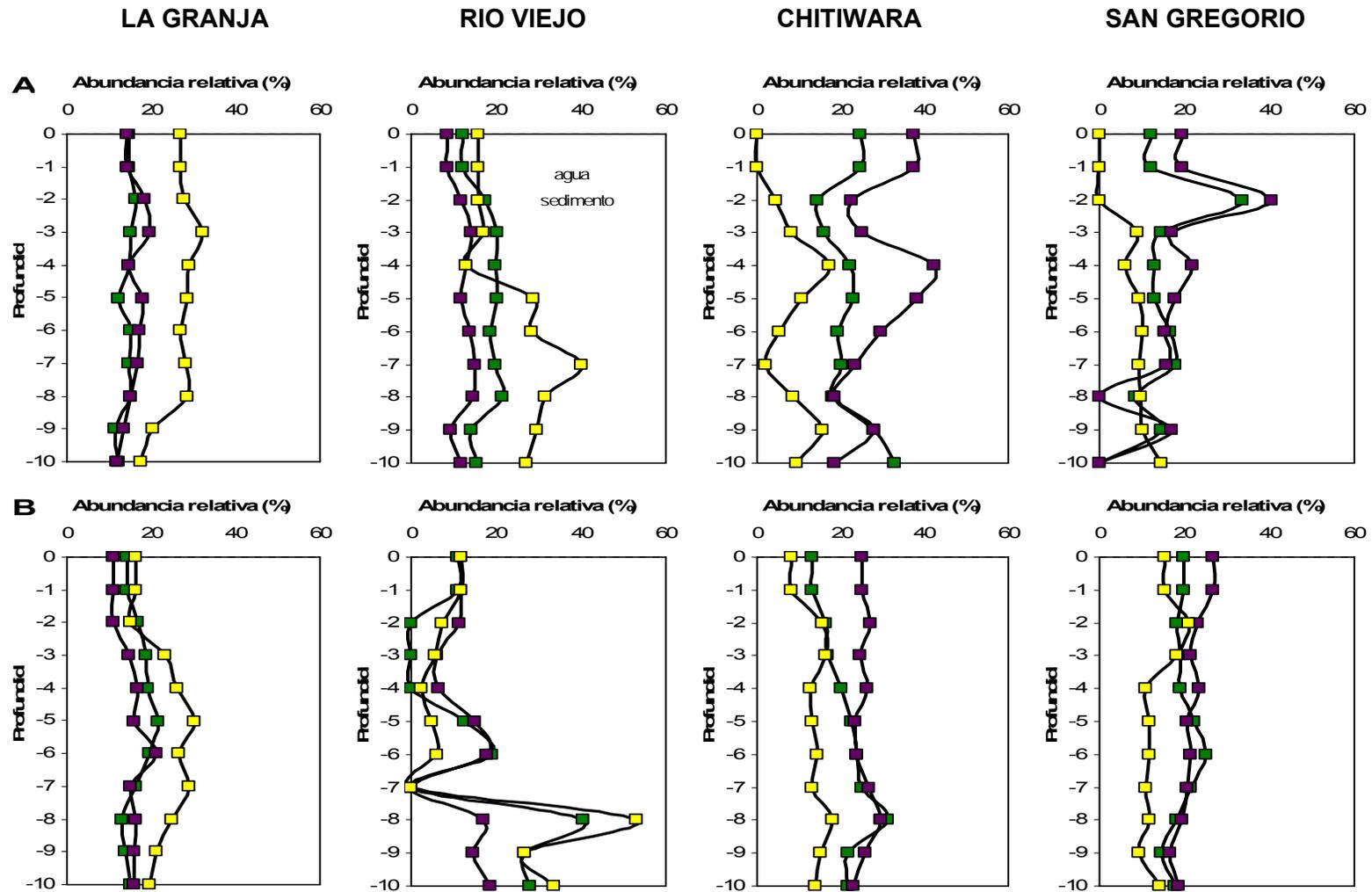
##### **Comunidad de MA**

En cuanto a los grupos de MA, Chitiwara (CEN) mostró una distribución de todos los grupos a lo largo de todo el perfil, a excepción del grupo MSMX el cual se hallo ausente en el 1 y 7 cm. Chitiwara (DEM) mostró un distribución relativamente similar de los 3 grupos de MA alternando en ciertos puntos del perfil (Gráfica 5B). En San Gregorio (CEN y DEM), se observo una tendencia similar a la descrita en Chitiwara, encontradote ausente a MSMX en los dos primeros centímetros en CEN (Gráfica 5A).



Gráfica 4444. Abundancia relativa de los sub-grupos de SRB. DFM (■), DBB (■), DSB (■), DCC (■) y DSV (■) en cada centímetro del perfil en profundidad. A, punto de muestreo CEN; B, punto de muestreo DEM.

Eliminado: 4



Gráfica 5555. Abundancia relativa de los grupos de MA, MC (■), MG (■) y MSMX (■) en cada centímetro del perfil en profundidad. A, punto de muestreo CEN; B, punto de muestreo DEM.

Eliminado: 5

### **6.4.3. Estructura cuantitativa de las comunidades microbianas de SRB y MA entre lagunas**

De manera general se observa que las lagunas de aguas blancas presentaron porcentajes de abundancia de SRB y MA relativamente más bajos que los encontrados en las lagunas de aguas negras (Anexo 3). Por otra parte, las lagunas de aguas blancas presentaron en ambos sitios de muestreo (CEN y DEM) como grupos más abundantes de SRB y MA a DFM y MSMX, respectivamente, a excepción del sitio CEN en La Granja, donde DBB resultó ser el grupo de SRB mayoritario. En contraste, las lagunas de aguas negras presentaron como grupos abundantes a DBB y MG, a excepción del sitio CEN en Chitiwara donde DFM resulta ser el subgrupo más abundante de SRB. Por otra parte DSV resaltó como el grupo menos abundante en los dos tipos de lagunas (Gráfica 6).

#### **a. Lagunas de aguas blancas**

El subgrupo de SRB más abundante en La Granja (CEN) fue DBB (20%) mientras que en La Granja (DEM) se encontró a DFM (22%), siendo DSV el grupo menos abundante tanto en CEN como en DEM (14% y 13%, respectivamente). En Río Viejo (CEN y DEM), el subgrupo de SRB más abundante fue DFM (30% y 34%, respectivamente), siendo DSV (11%) el grupo menos abundante en CEN y DCC (10%) en DEM (Gráfica 6).

En relación a los grupos de MA, tanto en el sitio CEN como en DEM en La Granja, se encontró que el grupo más abundante fue MSMX (26% y 23%, respectivamente) y como el grupo menos abundante MC (14%) y MG (15%), respectivamente. De igual manera ocurre con el sitio CEN en Río Viejo, donde el grupo más abundante es MSMX (23%) y como el menos abundante a MG (12%), mientras que en el sitio DEM en Río Viejo, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos pues ambos se presentan en una misma proporción en el perfil con un valor del 11 al 12% (Gráfica 6).

#### **b. Lagunas de aguas negras**

En Chitiwara (CEN) mostró como subgrupo de SRB más abundante a DFM (22%) y como el menos abundante a DSB (12%). En Chitiwara (DEM), DBB resultó ser el subgrupo más

abundante (35%), siendo el grupo menos abundante DSV (20%). Mientras que en San Gregorio (CEN y DEM), el subgrupo más abundante fue DBB (35% y 51%, respectivamente), siendo el grupo menos abundante DSV (18%).

En cuanto a los grupos de MA, tanto en el sitio CEN y DEM, Chitiwara y San Gregorio mostraron como grupo más abundante a MG (27% y 26% (CEN) y 26% y 21% (DEM)) y como el grupo menos abundante a MSMX (8% y 14% (CEN) y 14% (DEM)) (Gráfica 6).

### 6.5. Distribución de SRB y MA y asociación con factores fisicoquímicos y geoquímicos

El análisis de correlación entre la distribución y abundancia de las comunidades microbianas de SRB y MA y las características fisicoquímicas y geoquímicas, mostró que en **las lagunas de aguas blancas**, el contenido de agua y la concentración de carbono y nitrógeno presentó asociación con la abundancia de MA ( $-0.93 < r < -0.46$ ), a excepción de La Granja (CEN) que favorece a SRB ( $0.74 < r > 0.63$ ). En relación al pH y Eh, estas se muestran variables tanto para SRB y MA. En **las lagunas de aguas negras**, la concentración de carbono y nitrógeno, el pH, el Eh y el contenido de agua presentan mejor correlación con la comunidad de SRB, a excepción de San Gregorio (DEM) que favorece a MA (Tabla 7).

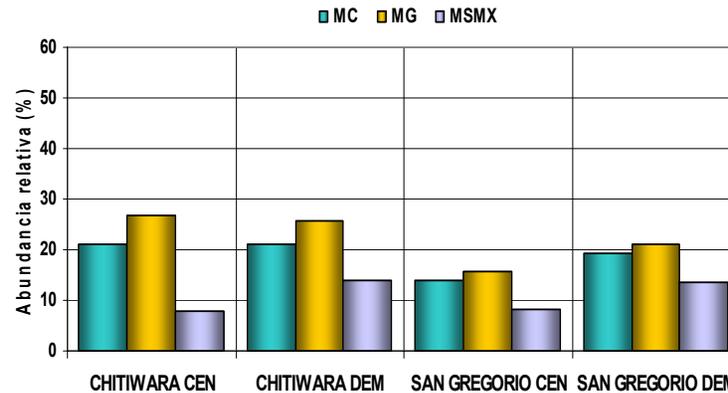
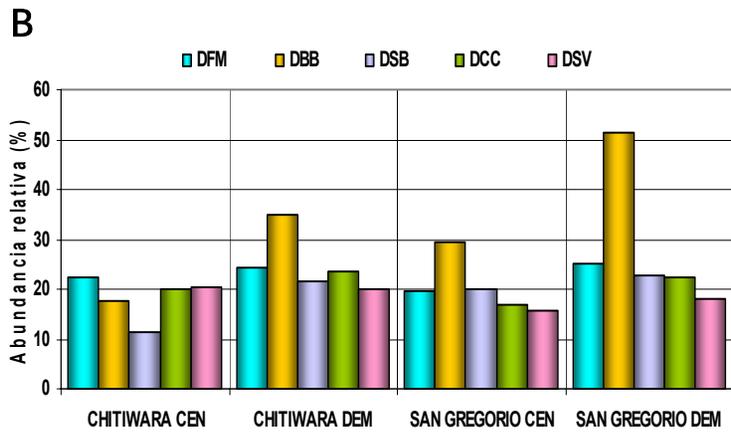
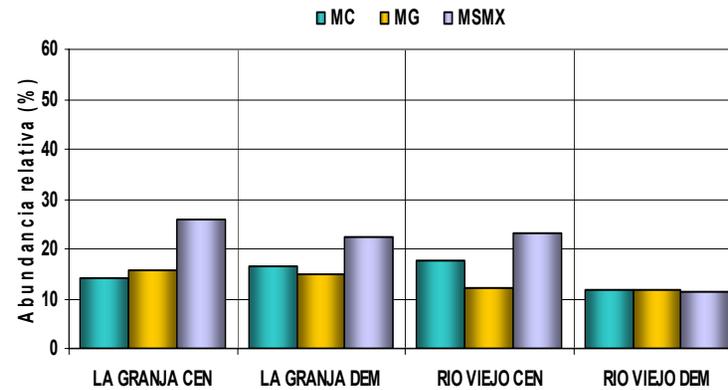
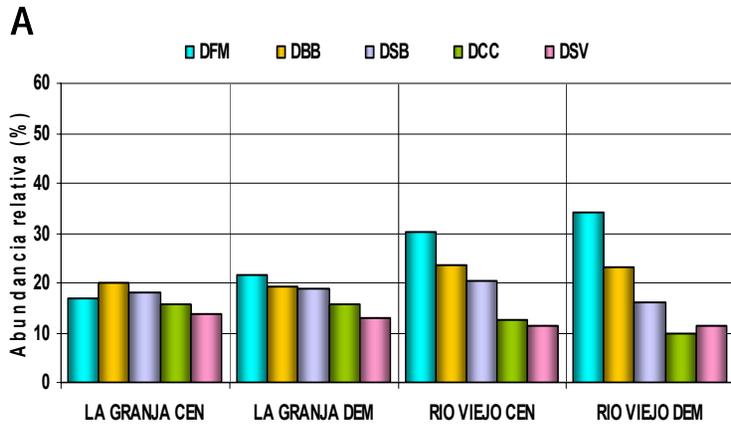
Tabla 777. Índice de correlación entre la comunidad de SRB y MA y los factores fisicoquímicos y geoquímicos en cada laguna en estudio

Eliminado: 7

	%C	%N	pH	Eh	%Agua		%C	%N	pH	Eh	%Agua
<b>La Granja CEN</b>						<b>Chitiwara CEN</b>					
<b>SRB</b>	0	0	-0,20	-0,98	0,72	<b>SRB</b>	0,56	0,56	-0,41	0,35	0,75
<b>MA</b>	0	0	0,24	-0,67	0,22	<b>MA</b>	0,08	0,20	0,10	-0,18	0,17
<b>La Granja DEM</b>						<b>Chitiwara DEM</b>					
<b>SRB</b>	-0,78	-0,70	0,23	0,23	-0,79	<b>SRB</b>	-0,67	-0,72	-0,62	0,50	-0,89
<b>MA</b>	-0,93	-0,89	0,36	0,19	-0,96	<b>MA</b>	-0,36	-0,42	-0,46	0,24	-0,66
<b>Río Viejo CEN</b>						<b>San Gregorio CEN</b>					
<b>SRB</b>	-0,41	-0,44	-0,06	-0,57	-0,50	<b>SRB</b>	0,39	0,44	-0,27	0,36	0,52
<b>MA</b>	-0,68	-0,69	-0,39	-0,73	-0,52	<b>MA</b>	0,36	0,40	-0,20	0,31	0,46
<b>Río Viejo DEM</b>						<b>San Gregorio DEM</b>					
<b>SRB</b>	-0,22	-0,12	-0,27	-0,12	-0,25	<b>SRB</b>	0,36	0,33	-0,64	0,47	0,38
<b>MA</b>	-0,51	-0,46	0,12	-0,39	-0,52	<b>MA</b>	0,60	0,51	-0,70	0,73	0,68

**BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS**

**ARQUEAS METANOGENICAS**



Gráfica 6666. Comparación de la abundancia relativa de los sub-grupos de SRB y MA. A, Lagunas de aguas blancas; B, Lagunas de aguas negras. DFM (■), DBB (■), DSB (■), DCC (■), DSV (■), MC (■), MG (■) y MSMX (■).

Eliminado: 6

## 7. DISCUSIONES

### 7.1. Características generales de los perfiles sedimentarios

Las lagunas de aguas blancas (La Granja y Río Viejo) y de aguas negras (Chitiwara y San Gregorio) constituyen ecosistemas diferentes por sus características fisicoquímicas y geoquímicas, ya que las primeras se caracterizan por tener una baja concentración en sales y material orgánico (disuelto y en suspensión), un pH próximo a la neutralidad, mientras los segundos se caracterizan por que sus aguas son considerablemente ricas en material orgánico (particulado y coloidal), especialmente en carbono orgánico disuelto (COD), tienen un pH más ácido y contienen grandes concentraciones de ácidos húmicos y fúlvicos. Las características fisicoquímicas de ambas lagunas probablemente se reflejen también en sus propios sedimentos.

Además, es importante considerar que existen diferencias en la estructura de los perfiles sedimentarios, pues se debe considerar que en todas las lagunas se realizó el muestreo de dos sitios contrastantes; un sitio libre de vegetación (CEN), afectada principalmente por cambios producidos a causa del movimiento interno de sus aguas, influenciadas por la acción del viento y ciclos pluviales, que normalmente pueden provocar mezclas y remover las capas superiores del sedimento, provocando la turbidez de la columna de agua. Por lo tanto, la disponibilidad de substratos orgánicos e inorgánicos y la estructura de las comunidades sedimentarias se verán afectadas por estos cambios. El otro perfil sedimentario extraído debajo de una densa capa de vegetación de macrófitas propias de cada laguna (DEM), que por su presencia y propagación en esta área protege a los sedimentos de las perturbaciones externas, permitiendo mantener la forma más estable de los sedimentos. Por otro lado, la misma será responsable de los cambios producidos sobre la composición fisicoquímica del entorno de la superficie del sedimento, ya que los productos de la exudación radicular, la descomposición de materia orgánica y el desarrollo de comunidades microbianas o protozoarias adheridas o no adheridas, influyen sobre las condiciones bioquímicas del entorno y podrían provocar cambios sobre la estructura comunitaria de los sedimentos y que eventualmente tendría influencia directa sobre la variedad y cantidad de substratos disponibles para las SRB y MA.

Por lo tanto por las características mencionadas, el perfil sedimentario puede cambiar tan solo en milímetros de profundidad a causa del establecimiento de micronichos que explicaría la heterogeneidad espacial en el sedimento. Así tan solo las características propias de cada tipo de laguna junto con las características del sitio de colecta del perfil, podrían reflejar por si solos cambios importantes sobre las comunidades microbianas y viceversa.

## **7.2. Asociación entre la comunidad de SRB y MA y propiedades fisicoquímicas y geoquímicas de los perfiles sedimentarios**

Parámetros ambientales tales como el movimiento y contenido de agua, luz, temperatura, pH, nutrientes orgánicos e inorgánicos determinan el patrón estructural y de actividad de la comunidad microbiana en sedimentos, que a su vez influyen en su entorno mediante su metabolismo (Deming y Baross, 1993). Por lo tanto, los sedimentos son sistemas complejos afectados por la interacción de factores geoquímicos, fisicoquímicos y biológicos (Köster y Meyer-Reil, 2001).

### **7.2.1. Porcentaje de agua y densidad**

Los sedimentos tienen influencia directa sobre las interacciones hidrológicas entre el agua superficial y el agua subterránea. Asimismo, estos están acoplados a la densidad poblacional y la composición de la materia vegetal presente sobre los sedimentos y que influyen sobre la diversidad de las comunidades microbianas. Las lagunas estudiadas además son caracterizadas como planicies de inundación, debido a que en época de lluvias pueden estar en contacto directo con aguas del Río Beni (La Granja y Río Viejo) o tener un aporte de agua pluvial (Chitiwara y San Gregorio) que modifican sus condiciones fisicoquímicas y geoquímicas

En **las lagunas de aguas blancas**, los sedimentos del sitio CEN y DEM se ven influenciada por las aguas provenientes del río Beni, que en épocas de lluvias entran en contacto directo con el río Beni, lo que perturbaría sus sedimentos en especial en la zona litoral (DEM) lo que explicaría la leve compactación y el aspecto lodoso de sus sedimentos, mientras que CEN por situarse más distante al río presenta sedimentos levemente más compactos al observado

en DEM (Gráfica 1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de la distribución del contenido de agua entre CEN y DEM ( $0.90 < r > 0.64$ ) (Anexo 1).

Un comportamiento contrario se observó en **las lagunas de aguas negras**, donde los sedimentos del sitio CEN presentaron mayor contenido de agua confirmando a sus sedimentos un aspecto lodoso en Chitiwara e inconsistente en San Gregorio que tal vez se explique por que los mismos tengan influencia directa de las precipitaciones pluviales, por la ausencia de materia vegetal y por características propias de sus partículas sedimentarias que son arcillosas resultando ser probablemente el sitio más perturbado (Gráfica 2). Mientras que el sitio DEM presenta mayor compactación de sus sedimentos confirmando un aspecto gredoso al sedimento en Chitiwara y un sedimento muy compacto en San Gregorio (Tabla 2), que probablemente se explique por la ausencia de cuerpos de aguas cercanos, por lo que sus sedimentos se encontrarían menos perturbados. Además, la vegetación presente en el sitio DEM puede controlar o reprimir los procesos ecológicos en las lagunas (Gregory *et al.*, 1991) pues tienen un efecto de retroalimentación o feedback sobre el flujo de agua y materia en los sedimentos. Por lo tanto, las diferencias entre la textura y compactación de sus sedimentos se explican por su contenido de agua que es diferente al observado en las lagunas de aguas blancas (Anexo 1). Sin embargo, al igual que las lagunas de aguas blancas, estas lagunas no mostraron diferencias significativas en la distribución del contenido de agua entre los sitios CEN y DEM ( $0.78 < r > 0.66$ ).

La biota de los sedimentos acuáticos es extremadamente sensible a las alteraciones hidrológicas produciendo cambios en la composición de grupos microbianos funcionales por procesos tales como el flujo de agua y la frecuencia de inundaciones (McCabe y Gotelli 2000). Por lo tanto las comunidades microbianas de SRB y MA, también se verían afectadas por los mismos. Por otra parte cabe mencionar que la concentración de oxígeno disuelto en las lagunas estudiadas, se encuentra dentro del rango subóxico ( $0.1 - 6 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ), a excepción de San Gregorio que presenta una concentración de  $6.90 \text{ mgO}_2/\text{L}$  que corresponde a un ambiente óxico (Tabla 6). Por lo tanto, como todos los perfiles muestran un contenido en agua mayor al 50% los sedimentos presentan una cierta concentración de oxígeno disuelto que de alguna manera podría influir sobre los procesos metabólicos aerobios y anaerobios.

Así, la correlación observada entre la comunidad microbiana de SRB y MA y el porcentaje de agua, muestra que la comunidad de MA presentaría mejor correlación que SRB en las **lagunas de aguas blancas** ( $-0.92 < r > -0.52$ ), a excepción de La Granja (CEN) donde se observa lo contrario ( $r = 0.72$ ). Por lo tanto, si bien las metanógenas son extremadamente sensibles al oxígeno bajo condiciones de laboratorio y son capaces de morir aun a concentraciones bajas de  $O_2$ , estudios recientes (Galagan *et al.*, 2006) sugieren la presencia del operón citocromo *d* oxidasa homólogo al encontrado en *E. coli*, en algunas MA como *Metanosarcina acetivorans*, la cual participa en un paso importante en la respiración dependiente de  $O_2$  (Cotter *et al.*, 1997), y que podría explicar la presencia de MA en ambientes subóxicos. Por otra parte, en las **lagunas de aguas negras**, las SRB presentan mejor correlación que las MA ( $0.75 < r > 0.52$ ), a excepción de San Gregorio (DEM), donde se observa lo contrario ( $r = 0.68$ ) (Tabla 6). La distribución de las SRB en estas lagunas se explica por que son capaces de tolerar el oxígeno presente (Marschall *et al.*, 1993; Sass *et al.*, 1997; Eschemann *et al.*, 1999) sugiriendo que algunas SRB consumen  $O_2$  por respiración (Dillin y Cypionka, 1990; Dannenber *et al.*, 1992; Marschall *et al.*, 1993, Dolla *et al.*, 2006) como un mecanismo para evitar la exposición al oxígeno molecular (Eschemann *et al.*, 1999). Lo que explica la presencia y abundancia de todos los subgrupos de SRB a lo largo de todo el perfil y que sugiere que las SRB puede ser aisladas de capas superficiales óxicas en un número similar o mayor al detectado en las zonas anóxicas (Jorgensen y Bak, 1991; Sass *et al.*, 1997).

### 7.2.2. pH y potencial oxido-reductor

El resultado de la competición y coexistencia entre SRB y MA por el mismo sustrato depende de las condiciones ambientales, siendo el factor más importante el pH (V. O'Flaherty, *et al.*, 1998), además el mismo influye sobre la especiación del carbono (Maberly, 1996). Es así que tanto las SRB y MA pueden tener diferentes pH óptimos así como también un rango de pH para su crecimiento, por lo tanto el pH es un factor importante que podría determinar cual de estas dos poblaciones microbianas se vuelve dominante durante el proceso de mineralización de la materia orgánica. Aunque, O'Flaherty *et al.* (1998), indican que a pH entre 6.8 a 7.1 podrían inhibir a las SRB y MA, esta inhibición se encuentra relacionada con la concentración de  $H_2S$ , ya que la misma puede convertirse altamente tóxica a pH elevados (Zinder, 1993; Visser, 1993) y que se observe en ambientes ricos en concentración elevadas

de sulfato (aguas marinas), sin embargo en aguas dulces la concentración de  $H_2S$  parece no inhibir a las mismas, sino mas bien contribuye a mantener la concentración de sulfato por su reoxidación en la interfase óxica/anóxica debido a la acción de bacterias quimiolitótrofas y fotolitótrofas (Holmer y Storkholm, 2001). Sin embargo, en este estudio se encontró que tanto las SRB como las MA se encuentra entre el rango de pH de 5.4 a 8 y que se encuentra dentro del valor medio ideal 4 a 8 tanto para las SRB (Campeau y Bartha, 1984, 1985; Steffan *et al*, 1988) como para las MA (Visser, 1995; Widdel 1998). Los valores de pH en las lagunas de aguas blancas mostraron valores cercanos a la neutralidad y que resultan ser ligeramente mas elevados que los observados en las lagunas de aguas negras (Anexo 1).

Las **lagunas de aguas blancas** mostraron valores de pH próximos a la neutralidad, mostrando una leve correlación con la comunidad de MA ( $-0.39 < r > 0.24$ ) y SRB ( $0.23 < r > -0.06$ ) (Tabla 7). Por otra parte, La Granja (CEN) constituye un caso particular, pues entre los 4 a 7 cm de profundidad se observo un pH ligeramente alcalino ( $pH > 7.5$ ). Si bien otros estudios (Widdel, 1988; Colleran *et al.*, 1995; Oude-Elferink *et al.*, 1994) sugieren que a este pH las SRB tienen mejores condiciones de crecimiento que las MA y podría esperarse una competición de las SRB sobre las MA (Widdel, 1988; Colleran *et al.*, 1995; Oude-Elferink *et al.*, 1994), en este estudio se registro una disminución en la abundancia de todos los grupos de SRB, mostrando a DFM como el grupo menos abundante en estos puntos, a excepción de DSV el cual incremento en abundancia (Gráfica 1 y 4). En cambio la abundancia y distribución de la comunidad de MA no se vio influenciada por el pH y no se observo una disminución de las mismas a este rango de pH (Gráfica 5). Mientras que en **las lagunas de aguas negras** que mostraron pH bajos (ligeramente ácidos) presentarían una mejor correlación con las SRB ( $-0.62 < r > -0.27$ ) que con MA, aunque en San Gregorio (DEM), se observo lo contrario ( $r = -0.7$ ).

Por otra parte, el sitio DEM de todas las lagunas reporto un pH ligeramente ácido comparado con el sitio CEN (Anexo 1) que probablemente se atribuya a las características propias de este sitio (cubierto por materia vegetal) donde se producen procesos de reducción que de alguna manera influyen sobre el pH del sedimento. Además las lagunas de aguas negras por su elevado contenido orgánico exhiben una característica similar presentando un pH relativamente más bajo (ligeramente ácido) al de las lagunas de aguas blancas (Gráfica 1 y 2). Sin embargo, las diferencias entre los valores de pH entre el sitio CEN y DEM no son

significativas ( $-0.33 < r > 0.18$ ) (Anexo 1), y por lo tanto no se observó una asociación significativa sobre la distribución de SRB y MA relacionadas con el pH (Gráfica 4 y 5) (Tabla 7). Sugiriendo que otros factores tales como la concentración de sulfato, afinidad por el sustrato, inhibición por sulfuro y la naturaleza del medio podrían también determinar el resultado de la abundancia y distribución de SRB y MA (V. O'Flaherty, *et al.* 1998).

Si bien el Eh ideal para las SRB debe encontrarse inferior a -200 mV, la variación de este factor fisicoquímico en los dos puntos (CEN y DEM), en general parece no influir sobre las SRB tal como se reportó en otros estudios (Luna, 2004; Sanchez, 2005; Hoehler *et al.*, 2001), A excepción de La Granja (CEN) donde el Eh oxidativo presenta una elevada correlación con la comunidad de SRB ( $r = -0.96$ ) (Tabla 7). Sin embargo, este estudio mostró diferencias significativas asociadas a la distribución individual de cada uno de los subgrupos de SRB, ya que en las lagunas donde el Eh presenta un carácter oxidativo, DBB parece ser el grupo más abundante, tal como se observa en el sitio CEN de La Granja ( $r=0.9$ ) y en el sitio DEM de San Gregorio (Gráficas 1, 2, 4) ( $r = -0.32$ ) (Anexo 6). Además, cuando el Eh es más reductivo como p.e. en el sitio CEN de Chitiwara entre los 5 a 10 cm de profundidad, DBB se encuentra ausente (Gráfica 4). Por lo tanto, DBB presenta correlación con el Eh en especial en las lagunas de aguas negras ( $-0.56 < r > -0.32$ ) (Tabla 7) (Anexo 6), sin embargo debe asumirse que existirían otros factores que influyen en su distribución y abundancia. En cuanto a las MA parecen no ser afectadas directamente por el Eh ya que muestran un patrón más homogéneo de distribución.

### 7.2.3. Porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno

Las diferencias observadas en cuanto a la disponibilidad de materia orgánica tanto en CEN como DEM de las lagunas de aguas blancas y negras, podría explicarse por la heterogeneidad espacial de las propiedades de los sedimentos (Rudd *et al.*, 1986; Snopek *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1997), la cual puede ser manifestada por la disponibilidad del sustrato y por la estratificación de las comunidades microbianas, tal como se observa en los dos sitios de muestreo contrastantes (CEN y DEM).

En general **las lagunas de aguas blancas**, presentaron valores porcentuales bajos de carbono y nitrógeno, ya que estas lagunas tienen una baja cantidad de sales y material

orgánico (disuelto y en suspensión), que podría influir sobre las condiciones fisicoquímicas y geoquímicas del sedimento. En especial La Granja (CEN) mostró los valores porcentuales más bajos de carbono y nitrógeno (Gráfica 1) quizás como consecuencia de la poca deposición de material orgánico en este sitio (libre de vegetación), mostrando una diferencia significativa del contenido de carbono y nitrógeno comparada con el sitio DEM ( $r = 0.49$  y  $r = 0.52$ , respectivamente) (Anexo 1). Además, el sitio DEM se ve favorecido por el proceso degradativo de la material vegetal (raíces, hojas, etc.) presente en este sitio, lo que también podría explicar las diferencias encontradas entre CEN y DEM en Río Viejo, aunque no se observaron diferencias significativas ( $r = 0.84$  y  $r = 0.91$ , respectivamente), probablemente por que esta laguna se encuentra más alejada del Río Beni y por lo tanto podría estar menos perturbada. Del mismo modo en **las lagunas de aguas negras**, tanto el sitio CEN como DEM mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de carbono y nitrógeno, particularmente en San Gregorio ( $r = 0.23$  y  $r = 0.11$ , respectivamente) (Anexo 1), a causa de que sus sedimentos se ven influenciados por sus aguas ricas en material orgánico (particulado y coloidal), y por el aporte de materia orgánica proveniente del sitio DEM. Así, comparando los valores porcentuales de carbono y nitrógeno entre las lagunas de aguas blancas y negras, se encontraron diferencias significativas entre ambas con un  $r = 0.33$  para carbono y  $0.29$  para nitrógeno (Gráficas 1 y 2) (Anexo 2).

Así mismo, los procesos de mineralización microbiana en sedimentos se ven influenciados por la disponibilidad del sustrato (Egli *et al.*, 1993), la cual esta frecuentemente asociada con la materia orgánica. Schultz *et al.* (2007), explica esta dependencia a través de una interpretación termodinámica de conceptos teóricos tales como la calidad de materia orgánica (Bosatta y Agren, 1999) indicando que existen diferentes tasas de descomposición y de razón C/N. Es así, que la razón carbono/nitrógeno es utilizada para resaltar la calidad del sustrato (materia orgánica) disponible y la influencia del entorno sobre los sedimentos (Ingall y van Cappelen, 1990; Middel-burg *et al.*, 1996; Köster y Meyer-Reil, 2001; Helland *et al.*, 2003). De este modo, si la razón C/N es baja, sugiere una fácil degradación de la materia orgánica y por lo tanto una alta calidad nutricional, mientras que si la razón C/N es elevada indica que la materia orgánica presente es refractaria a la descomposición (Köster y Meyer-Reil, 2001), aspecto que podría influir directamente sobre la abundancia y diversidad de las comunidades microbianas.

De tal manera los resultados anteriores también podría explicarse por la razón C/N, ya que en el sitio DEM de **las lagunas de aguas blancas** la razón C/N resulto ser mas elevada que en CEN (Tabla 5), y puede ser posible que una porción significativa de la materia orgánica sea refractaria a la descomposición (probablemente debido a la presencia de lignina y celulosa en este sitio), por otra parte los valores porcentuales bajos de la razón C/N encontrados en el sitio CEN sugieren que el material orgánico de este sitio es degradado fácilmente. Por lo tanto, ambos sitios de muestreo mostraron diferencias significativas en función a la razón C/N ( $0.47 < r > 0.06$ ). Mientras que en **las lagunas de aguas negras** se observo variabilidad en relación a la razón C/N. Así, Chitiwara (CEN) y San Gregorio (DEM) mostraron la razón C/N elevada sugiriendo que la materia orgánica de estos sitios es refractaria a la descomposición, sin embargo la razón C/N no sería determinante sobre la abundancia y distribución de SRB y MA en estas lagunas por el elevado contenido orgánico, característica propia de estas lagunas. (Tabla 5). Observándose una relación inversa entre ambos sitios de muestreo ( $-0.75 < r > -0.32$ ).

En **las lagunas de aguas blancas**, en La Granja (CEN), parece no existir ninguna asociación significativa entre la distribución y abundancia de SRB y MA y el contenido de carbono y nitrógeno ( $r= 0$ ) (Tabla 7), que se explicaría por la distribución homogénea de carbono y nitrógeno en este sitio (Gráfica 1). En La Granja (DEM), se observo una correlación inversa entre la abundancia de SRB y MA ( $-0.93 < r > -0.70$ ) (Tabla 7), observándose que entre los 2 a 5 cm cuando la concentración de carbono y nitrógeno disminuye existe un incremento en la abundancia tanto de SRB y MA, sugiriendo que en esta fracción existiría un incremento tanto de la actividad sulfato reductora y metanogénica. Algo similar aconteció tanto para SRB y MA en Río Viejo (CEN) entre los 4 a 10 cm ( $-0.69 < r > -0.44$ ), mientras que Río Viejo (DEM) no se encontró una asociación significativa tanto para SRB como MA (Tabla 7), que mostraron un patrón similar de distribución y abundancia. Por lo tanto, la disminución de la abundancia observada en La Granja (CEN) para las SRB y MA entre 4 a 7 cm de profundidad (Gráfica 4) y la abundancia de SRB y MA en las capas profundas del perfil (8 – 10 cm) en Río Viejo (DEM), estarían mas influenciados por otros factores tales como el movimiento y contenido de agua, luz, temperatura, pH y otros que determinarían el patrón estructural y de actividad de la comunidad microbiana en sedimentos (Deming y Baross, 1993), los cuales podrían influir en la disponibilidad y captación del material orgánico por las comunidades microbianas.

En las **lagunas de aguas negras**, en Chitiwara (CEN) entre los 2 a 4 cm se observa un leve incremento del material orgánico (Gráfica 2), el mismo que coincide con el incremento de todos los grupos de MA y SRB a excepción de DCC, mientras que a mayor profundidad, cuando el contenido orgánico decrece entre los 5 a 8 cm la abundancia de las SRB y MA también disminuye (Gráfica 4 y 5), esta heterogeneidad observada tanto para los grupos de SRB y MA en el sitio CEN (pequeña área de agua libre) podría estar influenciada por la materia orgánica proveniente de las macrófitas circundantes a este sitio y parecería estar más asociada con la distribución y abundancia de las SRB mostrando un valor de correlación de 0.56. Mientras que en Chitiwara (DEM) cuando la cantidad de material orgánico disminuye entre los 4 a 10 cm se observa un incremento en la abundancia de ambas comunidades (Gráfica 2 y 4), mostrando una relación inversa ( $-0.72 < r > -0.36$ ) la cual podría explicarse por el alto grado de eutrofización de esta laguna que conduce a procesos reductivos que conlleva al consumo de la materia orgánica y consecuentemente favorecen a la producción de biomasa microbiana. Un caso particular se constituye en San Gregorio (CEN), ya que por tener los valores más elevados de carbono y nitrógeno se esperaría una mayor abundancia de la población de SRB y MA sin embargo no se observo una relación significativa (Tabla 7), sugiriendo que otros factores como la naturaleza de esta laguna (tierra firme), la elevada inconsistencia de su sedimento junto con el elevado contenido de agua (Deming y Baross, 1993), podrían sugerir un ambiente adecuado para la acumulación de material orgánico pero no para la distribución y abundancia de comunidades microbianas. Un comportamiento similar se observo en el sitio DEM de esta laguna, mostrando un patrón similar tanto para las SRB y MA, sugiriendo una mejor asociación para MA ( $0.60 < r > 0.51$ ). En general, tanto en las lagunas de aguas blancas como negras mostraron mayor contenido de carbono y nitrógeno en los dos primeros centímetros del perfil, que coincide con la abundancia observada de SRB y MA.

Por lo tanto, la actividad microbiana se ve afectada por los procesos químicos y metabólicos que ocurren en los sedimentos acuáticos (Peroni y Rossi, 1986). A su vez como resultado de la mineralización de la materia orgánica ocurre una subsiguiente liberación de nutrientes hacia el medio conduciendo a un cambio en las condiciones existentes del sedimento (Deming y Baross, 1993) que influyen sobre el estatus trófico de los habitats acuáticos y en general sobre todo el ecosistema. Además, el metabolismo microbiano conduce a la formación de biomasa bacteriana que sirve como una fuente de alimento para los

organismos béticos (Hondeveld *et al.*, 1992), consecuentemente ejerce influencia en la transferencia y flujo de carbono en la cadena trófica. Así, la calidad de la materia orgánica presente influiría sobre la densidad y distribución de las comunidades microbianas de los sedimentos (Danovaro *et al.*, 1998; Helland *et al.*, 2003).

### **7.3. Extracción de RNA a partir de muestras sedimentarias y consideraciones metodológicas para la hibridización cuantitativa en membrana**

El método de conservación de muestras ambientales podrían influir sobre los resultados de hibridización (Sessitsch *et al.*, 2002; Keith *et al.*, 2005), por lo que en este estudio todas las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento para evitar la degradación del RNA. Sessitsch *et al.* (2002), mostró que las muestras ambientales que fueron congeladas fueron optimas para una mejor extracción de RNA, probablemente por el cambio de temperatura (freeze-thawing) que permite una eficiente lisis celular.

Es así que una de las principales variables a evaluar para los ensayos de hibridización resulta ser la extracción del RNA a partir de muestras ambientales. Por lo que el método empleado en este estudio (Fleming-CTAB) se desarrollo con el propósito de minimizar los contaminantes que puedan ser co-extraídos, tales como; sustancias húmicas y DNA, pues se sabe que los mismos tienen efecto sobre la señal de hibridización (Alm *et al.*, 2000).

El método Fleming-CTAB se basa en la utilización de una solución desnaturizante que emplea un mecanismo de lisis por solubilización de las membranas celulares utilizando un detergente (SDS) y un quelante (EDTA) a 60 °C. Las sustancias húmicas fueron removidas mediante la utilización de CTAB (hexadecylmethylammonium bromide), fenol y lavados con cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Además, el fenol es utilizado para prevenir la degradación del RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Sin embargo como el 80% del carbono orgánico en suelos consiste de sustancias húmicas (Torsvik *et al.*, 1990), las sustancias húmicas presentes en las muestras pueden extraerse con los ácidos nucleicos lo cual se evidenció por la presencia de color en los extractos, ya que son resistentes a los procesos de degradación. Las lagunas de aguas negras presentan elevadas concentraciones de ácidos húmicos, lo que explica el color intenso de sus extractos. Sin embargo, debe considerarse que la co-extracción de sustancias húmicas interfiere en la hibridización (Tijssen, P. 1993).

No obstante, no existen datos sobre la concentración de ácidos húmicos en las lagunas en estudio, y otros estudios similares mostraron que la concentración  $>1.4$  ug afectan la señal de hibridización.

Por otra parte el fenol utilizado en esta mezcla tiene un pH 5,1 que causa la hidrólisis y separación del DNA y la solubilización del RNA, no obstante, algunas muestras aun presentaron DNA, como se reporto por otros estudios (Simon y Azam, 1989; Southern, 1993; Stahl *et al.*, 1988; Steffan *et al.*, 1988; Stumm y Morgan, 1996), que se explica por que en gran parte las poblaciones de muestras ambientales se encuentran con frecuencia en la fase estacionaria del crecimiento (alta razón DNA/RNA) (Wheeler *et al.*, 2000), por lo que el efecto del DNA sobre la señal de hibridización fue similar al observado con ácidos húmicos (saturación de la membrana). Una solución lógica a este problema sería remover el DNA de las extracciones de RNA mediante un tratamiento con DNasa. Sin embargo, se observo que los extractos sometidos a DNasas, incrementa la señal de 3.5% a 14.2%, pues algunos contienen RNasas activas que ocasionan una parcial degradación del RNA, lo que explicaría el incremento relativo de la señal de hibridización.

Por lo tanto, se debe considerar que la extracción de RNA directo es más efectiva en lugar de un subsecuente tratamiento con sistemas de purificación (columnas y tratamiento con DNasa) para no causar una parcial degradación del RNA y que será de vital importancia para producir una alta calidad de los resultados de hibridización (Moran *et al.*, 1993; Alm *et al.*, 2000). Así, en este método no se incluyeron técnicas de purificación ni la digestión del DNA ya que producen la introducción de sesgos en la cuantificación del RNA extraído, ya que gran parte del RNA puede perderse por estas técnicas (Alm y Stahl, 1999). Además, Alm *et al.* (2000), demostró que las sondas tienen mayor especificidad por el 16S rRNA que por el ADN, y no se observaron diferencias significativas con la presencia del ADN (Alm *et al.*, 2000)

La subsiguiente precipitación con isopropanol y lavados con etanol permiten la eliminación de los contaminantes restantes. Además, para prevenir la degradación enzimático del RNA, se realizó la inactivación de las nucleasas presentes tratando las soluciones y materiales utilizados con un desnaturalizante de proteínas (Dietilpirocarbonato al 1%(DEPC), ya que las nucleasas afectan en diferentes regiones del RNA y que también tienen serias influencias

sobre los resultados de hibridización (Ogram *et al.*, 1995). Este método fue exitosamente aplicado para el aislamiento de RNA de muestras sedimentarias (Fig. 1). La concentración de RNA extraído en ambas lagunas están en el rango obtenido por otros estudios en ambientes similares (agua dulce) (Ogram *et al.*, 1995, Ravenschlag *et al.*, 2000, Alm y Stahl, 2000, Frisher *et al.*, 2000, Sessitsch *et al.*, 2002, van Keulen, *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 1993, Felske *et al.* 1996, Fleming *et al.*, 1998).

La cantidad de RNA que se empleó para realizar la hibridización fue de 100 ng en todos los casos a excepción de la laguna San Gregorio en la que se empleo solo 50 ng, pues en esta laguna se observo una elevada contaminación por ácidos húmicos (extractos de color marrón oscuro). Considerar estas variaciones en el estudio fueron importantes ya que la relación entre la respuesta de la hibridización y la cantidad de RNA aplicado no es lineal, especialmente para elevadas cantidades de RNA aplicadas sobre la membrana a causa de la saturación de la membrana o interacciones entre sustancias húmicas y RNA que afecta la accesibilidad de la sonda hacia el target (16S rRNA) (Alm *et al.*, 2000).

Sin embargo, los procedimientos de lisis y extracción empleados para el aislamiento directo del RNA ribosomal de muestras sedimentarias deben tomar en cuenta factores tales como el contenido de compuestos orgánicos e inorgánicos y la biomasa de la muestra analizada, aunque se ha probado la eficiencia de este método para la extracción directa de RNA proveniente de otras matrices ambientales (p.e. rizósfera de macrófitas, lodos y lixiviado).

#### **7.4. Especificidad de las sondas**

La especificidad de las sondas utilizadas (rango de detección), se encuentra en directa relación a la complementariedad teórica de las mismas, en este caso con secuencias conocidas del 16S RNAr de, arqueas y bacterias y 18S RNAr de eucarias. La especificidad de las sondas se determino mediante su temperatura de hibridización (Temp. Hib.°C) en función a la temperatura melting (Tm) de cada sonda obtenida del Data probeBase y la concentración de sales (soluciones de estrigencia) (Tabla 1), empleando cepas de referencia tanto para SRB y MA, lo cual permitió reducir el rango de inespecificidad. Por otra parte, también debe considerarse que las regiones del 16S RNAr (secuencia altamente conservada) en el caso de la sonda universal y las sondas para dominios son menos estructuradas y por lo tanto son más susceptibles al clivaje por nucleasas, lo que podría

explicar la abundancia particular observada de estos dominios., así cuando la señal de hibridación de la sonda UNI es relativamente baja en relación a las sondas de los dominios, una parcial degradación de UNI debe ser considerada (Raskin *et al.*, 1996). Por lo tanto, en este estudio para la determinación de la abundancia relativa se utilizó la señal representada por la sumatoria total de los dominios ( $\Sigma$  ARCH+EUB+EUK denomina UNI ajustada) que representa una mayor señal a la observada por UNI. Por otra parte, las sondas más específicas, es decir las empleadas para detectar a los grupos de SRB y MA poseen estructuras más complejas y por lo tanto son menos susceptibles a la degradación por nucleasas (Raskin *et al.*, 1996). Por otro lado, la especificidad y fiabilidad de las sondas utilizadas ha sido confirmada recientemente (Loy *et al.*, 2002).

El set de sondas empleado en este estudio detectó a los cinco subgrupos de SRB y tres ordenes de MA, sin embargo como estas sondas se diseñan a partir de cepas cultivables probablemente se obvie la detección de especies no cultivables y nuevas en las muestras ambientales, por lo tanto deben desarrollarse nuevas sondas en base al lugar de estudio.

#### **7.5. Perfil vertical de la composición y abundancia de dominios**

El empleo de sondas 16S rRNA permitió realizar la identificación y distribución de comunidades microbianas en todo el perfil. Las sondas se extienden desde sondas generales para la identificación de dominios (arquea, bacteria y eucaria) hasta sondas especializadas para la detección específica de comunidades bacterianas a nivel de familias o género (SRB y MA) (Ramsing *et al.*, 1996).

Si bien en otros estudios (Schwarz *et al.*, 2006; Koizumi *et al.*, 2003, Koizumi *et al.*, 2004; Zepp-Falz, *et al.*, 1999) **arquea** representa solo una pequeña parte del total de la comunidad procariótica, en este estudio se observó que en todas las lagunas arquea muestra ser uno de los dominios más abundantes (Gráfica 3). Interesantemente esta abundancia se observa a lo largo de todo el perfil, incluyendo la interfase agua/sedimento, es decir en la zona óxica/subóxica, en lugar de la zona anóxica tal como lo reportan otros estudios (Schwarz *et al.*, 2006; Koizumi *et al.*, 2003, Koizumi *et al.*, 2004; Zepp-Falz, *et al.*, 1999). Debido a que en este estudio solo se tomó en cuenta a arqueas metanógenas y no así a la otra familia de arqueas (Crenoarqueotas), la abundancia de arquea también podría explicarse por la posible

abundancia de esta última sobre todo en las capas superficiales del sedimento en coincidencia con anteriores estudios (MacGregor *et al.*, 1997; Alm y Stahl, 1999).

Así mismo la elevada abundancia observada para **eucaria** a lo largo de todo el perfil en todas las lagunas en estudio podría explicarse probablemente por la cantidad de nutrientes presentes en el ecosistema acuático. De hecho, los sedimentos liberan nutrientes y contribuyen con mas del 80% de la entrada y liberación total de nutrientes hacia las lagunas (Larsen *et al.*, 1981), que a su vez conduce a la formación de biomasa bacteriana que sirve como una fuente de alimento para los organismos bénticos (Hondeveld *et al.*, 1992). La fauna béntica en los sedimentos consiste en su gran mayoría de pequeños organismos tales como anfípodos, cironomidos, nematodos, oligochaetes y algunos organismos largos tales como los bivalvos (Brinkhurst, 1974; Kayak, 1988) y metazoos, que aprovechan el sedimento para la deposición de sus huevos (Williams 1987). Por otra parte, se sabe que la actividad béntica probablemente inhiba la sulfato reducción en las capas superficiales, pero pueden estimular la misma en sedimentos profundos por la administración de sulfato y materia orgánica (Banta *et al.*, 1999). Sin embargo, no se conoce mucho sobre el impacto de la fauna béntica sobre el ciclo del azufre y son necesarios estudios futuros para evaluar su importancia (Holmer y Storkholm, 2001),

Interesantemente, en este estudio se observo un patrón homogéneo de la distribución y abundancia del dominio **bacteria** con la profundidad (Haglund *et al.*, 2003; Miskin *et al.*, 1998). Si bien en otros estudios indican que la actividad bacteriana y la biomasa son generalmente mas elevados en las capas superficiales de los sedimentos y que luego decrecen con la profundidad (Fisher *et al.*, 2002; Gächter *et al.*, 1988; Hendricks, 1996), se debe considerar la sobreestimación del número, como se observa en estudios con fluorocromos (DAPI) que tiñen tanto células muertas como partículas no bacterianas (Novitsky, 1987). Así también se debe considerar que si bien la abundancia bacteriana es elevada la actividad celular de bacterias es baja o solo una pequeña fracción de la comunidad bacteriana es metabólicamente activa en los sedimentos (Novitsky, 1987), por lo tanto los resultados encontrados a través del RNAr podría reflejan en cierto grado la actividad metabólica del perfil sedimentario.

Por otra parte la acumulación de grandes cantidades de materia orgánica provenientes de hojas y otro material vegetal, limita la circulación de agua guiando a un rápido consumo del oxígeno, limitando la difusión de oxígeno así como también la penetración de luz. El resultado del déficit en oxígeno conduce a la formación de ambientes anaerobios que se observan tanto en la superficie como en la profundidad de los sedimentos, lo cual favorece el desarrollo de comunidades anaerobias que suplementan al sistema con gases reducidos tales como el metano y sulfuro de hidrógeno que generalmente están representadas por MA y SRB, respectivamente. Por otra parte su baja abundancia también puede explicarse por que los mismos representan una fuente importante de alimento para la fauna béntica de la laguna (Pace, 1988; Bak y Nieuwland, 1997; Epstein, 1997).

La presencia de los tres dominios indica que cada uno de ellos participa en la mineralización de la materia orgánica, lo que conduce a la formación de micronichos en los sedimentos (Sweerts, Rudd y nelly, 1986; Namsaraev *et al.*, 1994), suponiendo la existencia frecuente de una considerable sobre posición entre los diferentes tipos de respiración (aerobia y anaerobia) (Lovley y Klug 1983; Capone y Kiene, 1988) permitiendo una distribución espacial heterogénea de las comunidades microbianas en los sedimentos. Por otra parte, el producto final o metabolitos formado por uno de ellos es el sustrato para el otro hasta que la mineralización de la materia orgánica sea completa. Además, el metabolismo de los sedimentos varía altamente y depende de las características individuales de cada laguna.

#### **7.6. Distribución y abundancia de comunidad de SRB y MA en sedimentos de lagunas de aguas blancas y aguas negras**

La estructura vertical detectada de SRB y MA en este estudio mediante hibridización con sondas específicas es indicativo de su abundancia relativa y diversidad similar a lo analizado en otros estudios (Okabe *et al.*, 1999; Purdy *et al.*, 2001; Purdy *et al.*, 2002; Koizumi *et al.*, 2003).

De acuerdo a la gráfica 6, las lagunas de aguas negras presentan mayor abundancia de SRB y MA que las lagunas de aguas blancas (Anexo 3), observándose diferencias significativas con valores de  $0.50 < r > 0.11$  para SRB y  $-0.65 < r > 0.04$  para MA (Anexo 4), que podría explicarse por las características fisicoquímicas y geoquímicas, así como la

interacción sintrófica entre SRB y MA que se ven favorecidas para las lagunas de aguas negras.

Del mismo modo, se observaron diferencias significativas entre la relación de abundancia y distribución de SRB y MA y los sitios de muestreo (CEN y DEM) (Tabla 6) (Anexo 6). Observándose mayor abundancia de SRB y MA en el sitio DEM (con vegetación), ya que este sitio podría ser responsable de los cambios producidos sobre la composición fisicoquímica del entorno de la superficie del sedimento, ya que los productos de la exudación radicular, la descomposición de materia orgánica y el desarrollo de comunidades microbianas o protozoarias adheridas o no adheridas, influyen sobre las condiciones bioquímicas del entorno y podrían provocar cambios sobre la estructura comunitaria de los sedimentos y que eventualmente tendría influencia directa sobre la variedad y cantidad de substratos disponibles para las SRB y MA.

Por otra parte, recientemente, la coexistencia de SRB y MA ha sido observada en presencia de concentraciones no limitantes de sulfato (Amann y Schleifer, 1995; Isa y Verstraete, 1986; Nanninga y Gottschal, 1986; Nielsen, 1987; Parkin *et al.*, 1990; Yoda *et al.*, 1987). Estas observaciones se atribuyen a diferencias en la colonización microbiana y propiedades de adhesión (Isa y Verstraete, 1986; Yoda *et al.*, 1987) o tóxicos variables de sulfuro (Hilton y Oleszkiewicz, 1988; Parkin *et al.*, 1990). Además, se encontraron poblaciones significantes de SRB en ambientes con niveles bajos en sulfato (Mancuso *et al.*, 1990; Thiele *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1992). Estas observaciones explican porque las SRB pueden crecer sintróficamente con metanógenas consumidoras de hidrógeno o formando co-cultivos definidos de lactato, etanol, propionato, fumarato y piruvato, eliminando su necesidad de reducir sulfato (Arche y Powell, 1985; Bryant *et al.*, 1977; Guyot, 1986; Jones *et al.*, 1983; Tasaki *et al.*, 1993; Traore *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1992).

Así mismo, estudios en sedimentos revelaron elevadas proporciones de sulfato reductores y metanógenas dentro de la zona de transición sulfato-metano lo que sugiere que la oxidación anaerobia del metano esta acoplada a la sulfato reducción (Iversen y Jorgensen, 1985; Thomsen *et al.*, 2001; D'Hondt *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2005). La reducción deasimilatoria del sulfato puede estar relacionada con la oxidación de substratos que son difíciles de degradar bajo condiciones anóxicas, tales como los alcanos y compuestos aromáticos, o aun

la oxidación anaerobia de metano en la zona de transición sulfato - metano (Iversen y Jorgense, 1985; Thomsen *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2004). Por lo tanto, desde que las bacterias sulfato reductoras y metanógenas en sedimentos puede competir por la misma fuente de carbono y donadores de electrones (Oremland *et al.*, 1978), la inhibición de las sulfato reductoras puede conducir el flujo de electrones a poblaciones metanógenas.

### 7.6.1. Comunidad de SRB

La distribución de SRB en relación al perfil en profundidad ha sido vista en diversos estudios a nivel de los 200 micrómetros de espesor (Schramm, *et al.* 1999), o en los primeros 10cm hasta capas mas profundas en sedimentos lacustres (Sass *et al.*, 1997; Fortín *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2001). Esta diversidad espacial explica la versatilidad metabólica de las SRB observada tanto en el sitio CEN como en DEM.

La sulfato reducción es un proceso que requiere ausencia de oxígeno y siendo que las lagunas estudiadas presentan un comportamiento óxico/subóxico, es de suponer que la concentración de oxígeno afectará la composición de los subgrupos de SRB, ya que se había sugerido que el oxígeno inactiva o inhibe algunas enzimas y proteínas utilizadas en el proceso de reducción (Canfield y Des Marais, 1991), sin embargo numerosos estudios (Marschall *et al.*, 1993; Sass *et al.*, 1997; Eschemann *et al.*, 1999) señalan que las SRB sobreviven bajo condiciones óxicas y habían mostrado consumir O<sub>2</sub> por respiración (Dillin y Cypionka, 1990; Dannenber *et al.*, 1992; Marschall *et al.*, 1993, Dolla *et al.*, 2006) como un mecanismo para evitar la exposición al oxígeno molecular (Eschemann *et al.*, 1999). Por lo tanto, las SRB pueden encontrarse en capas superficiales óxicas en un número similar o mayor al detectado en las zonas anóxicas (Jorgensen y Bak, 1991; Sass *et al.*, 1997), lo que explicaría la presencia y abundancia de SRB a lo largo de todo el perfil. Además, la capacidad de reducción del oxígeno parece ser mas pronunciada en cepas aisladas de sedimentos de aguas dulces que las aisladas de ambientes marinos, y que podría estar relacionado con la adaptación a concentraciones limitadas de sulfato que típicamente ocurre en sedimentos de aguas dulces pero no en sedimentos marinos (Dannenber *et al.*, 1992).

### a. Desulfotomaculum (DFM) – Subgrupo (1)

Este subgrupo incluye a los géneros *Desulfotomaculum* y *Desulfoesporosinus* que es el más abundante en las lagunas de aguas blancas, el mismo incrementa con la profundidad. Sass *et al.* (1997), encontraron que la distribución de DFM es específica con la profundidad, encontrando a DFM casi inexistente en la interfase agua/sedimento mientras que a mayor profundidad donde la región se torna anóxica se encontró mayor abundancia de este subgrupo. En contraste, en este estudio la distribución y abundancia de DFM se observa desde las capas superficiales hasta capas profundas del perfil, aunque no existen reportes sobre la tolerancia de DFM a condiciones óxicas, este es el único subgrupo de SRB gram (+) con capacidad de formar endoesporas volviéndose de este modo resistentes a condiciones adversas tales como la desecación y la oxidación del medio ambiente que a su vez le permite subsistir en una gran variedad de medios (Londry *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2000). Además, la concentración de oxígeno dentro de una simple partícula sedimentaria (heterogeneidad a microescala) puede variar fuertemente en unos pocos milímetros (Horner-Devine *et al.*, 2004), lo que a su vez conlleva a la formación de micronichos aerobios y anaerobios, que explicaría la abundancia de este subgrupo en las capas superficiales del sedimento. Además se observa que con la profundidad las condiciones se tornan mas favorables para su desarrollo lo que conduce a un enriquecimiento gradual del número de células bacterianas con la profundidad (Gráfica 4), lo cual también fue observado por Luna (2005).

Además en **las lagunas de aguas blancas** su distribución parece estar asociada al potencial oxido reductor, por lo tanto el carácter reductor en el sitio DEM podría favorecer la abundancia de este subgrupo ( $r= 0.55$  en La Granja y  $r=0.76$  en Río Viejo) (Gráfica 1 y 4) (Anexo 6). Por otra parte, la distribución de DFM a lo largo del perfil también se ve influenciada por la relación metabólica con otros subgrupos de SRB (DSV y DBB). Así, DFM conjuntamente con DSV y DBB son incapaces de oxidar acetato y por lo tanto utilizan lactato en mayor proporción conduciendo a la competición entre ellas por los mismos substratos tales como; etanol, lactato, formato, ácidos grasos, compuestos aromáticos y aminoácidos que son oxidados completamente. Por lo tanto, la abundancia observada en lagunas de aguas blancas podría verse favorecida por la entrada de estos nutrientes a partir de de aguas provenientes del río Beni (época de inundaciones). Por otra parte, la proporción C/N

de estas lagunas sugiere que la degradación de la materia orgánica es más accesible y por lo tanto la calidad de la materia orgánica favorecería su mineralización (Ingall y van Cappelen, 1990; Middelburg *et al.*, 1996; Raimbault *et al.*, 1999; Köster y Meyer-Reil, 2001; Helland *et al.*, 2003)

Constituyéndose, La Granja (CEN), un caso particular ya que en este sitio se observa una disminución de la abundancia de DFM en relación con la profundidad (en particular entre los 4 a 8cm), el cual parece tener una relación inversa con el pH ligeramente neutro a alcalino ( $r = -0.39$ ) y con el carácter oxidativo de este sitio ( $r = -0.69$ ), es decir que pH ligeramente alcalinos y Eh oxidativos o ligeramente reductivos tendería a disminuir la abundancia de DFM. Por otra parte, aunque la asociación con el porcentajes de carbono y nitrógeno ( $0.69 < r > 0.41$ ), podría explicar de igual modo la baja abundancia en este sitio, no se observa una influencia directa sobre este subgrupo, sugiriendo que factores tales como el pH y Eh, estarían más asociados a su distribución y abundancia (Gráfica 4) (Anexo 6)

Además, una característica particular se observo a los 7 cm de profundidad en Río Viejo (DEM) ya que solo se observa la presencia de DFM encontrándose ausente todos los demás subgrupos de SRB y MA, lo que sugiere su relación con otras comunidades microbianas no-SRB en este punto. Por otra parte Daly *et al.* (2000), indican que DFM muestra una distancia a nivel filogenético en relación a los otros subgrupos restantes (DBB, DSB, DCC y DSV), estando estrechamente emparentada con el orden clostridiales.

En **las lagunas de aguas negras** este subgrupo se presenta como el segundo subgrupo mas abundante, en San Gregorio (DEM) el carácter oxidativo de esta laguna junto con el pH ligeramente ácido parecen influir en la abundancia de DFM ( $r = 0.63$ ;  $r = -0.74$ , respectivamente) (Gráfica 2 y 4) (Anexo 6) como ocurrió en La Granja (CEN).

#### **b. Desulfobulbus (DBB) – Subgrupo (2)**

Este subgrupo esta estrechamente relacionado con la familia Desulfobacteriaceae, son oxidadores incompletos utilizan ácidos grasos de cadena corta (Widdel y Bak, 1992), y algunos pueden además crecer quimiolitro-autotroficamente por la desproporción de tiosulfato, sulfito o azufre elemental (Lovley y Phillips, 1994).

Este subgrupo estuvo presente en todos los perfiles sedimentarios, siendo más abundante en las **lagunas de aguas negras**, que podría explicarse por la relación existente con el potencial

oxido-reductor ( $r = 0.55$ ) (Anexo 6). Es decir, que valores de Eh reductivos podrían contribuir a disminuir la abundancia de DBB mientras que valores ligeramente reductivos con tendencia a un carácter oxidativo parecen favorecer la abundancia de DBB, tal como se observa en todo el perfil de San Gregorio (DEM) (Eh oxidativo) donde DBB resulta ser el grupo más abundante de todas las SRB estudiadas, mientras que en Chitiwara (CEN) (el sitio con el Eh más reductivo de las lagunas de aguas negras) DBB se encuentra ausente entre los 5 a 10 cm de profundidad ( $r = 0.11$ ) (Gráfica 2 y 4). Además, la capacidad de DBB de oxidar oxígeno (Ito *et al.*, 2002a; 2002b; Dolla, *et al.*, 2006), podría de igual modo explicar la abundancia de este subgrupo en ambientes ligeramente reductivos y oxidativos. Aunque se esperaría que estas lagunas de aguas negras presenten un Eh reductivo por ser ricas en materia orgánica, se debe considerar la época de muestreo (final de la época seca) ya que probablemente la mayoría de los sustratos fueron consumidos lo que explicaría el carácter ligeramente reductivo a oxidativo de estas lagunas. Esta relación de DBB con el Eh podría también explicar excepcionalmente la abundancia de DBB observada en La Granja (CEN) por el carácter oxidativo de dicha laguna ( $r = -0.90$ ), mientras que en las otras lagunas de aguas blancas presentan un Eh más reductivo que tiende a disminuir la abundancia de DBB (Gráfica 1 y 4) (Anexo 6).

Por otra parte los valores de pH observado en las **lagunas de aguas blancas** se encontraron próximos a la neutralidad y no presentan correlación con la distribución ni abundancia de DBB ( $0.44 < r > 0.08$ ). Mientras que en **las lagunas de aguas negras** donde se observe un pH ligeramente ácido parece estar asociado con la distribución y abundancia de DBB ( $r = 0.64$ ), ya que el pH podría influir en la disponibilidad y especiación de la materia orgánica (V. O'Flaherty, *et al.*, 1998) presente en este tipo de lagunas (Gráfica 1, 2 y 4) (Anexo 6)

Por otra parte, la disminución de la abundancia de DBB con la profundidad puede estar asociada a la reducida disponibilidad de sustratos (Minz *et al.*, 1999) a lo largo del perfil, además la actividad de DSV y DFM que utilizan los mismos sustratos que DBB conducirá a

una competencia por el sustrato. Es importante mencionar que DBB prefiere propionato como sustrato, el cual es oxidado de manera incompleta hasta lactato que eventualmente puede ser utilizado por la familia Desulfovibrionaceae (DSV), por los géneros Desulfotomaculum (DFM) y Desulfobacter (DSB) y por el subgrupo Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina (DCC), es decir los restantes cuatro subgrupos de SRB, lo que explica el patrón similar de todos los subgrupos de SRB a lo largo de todo el perfil en todas las lagunas (Gráfica 4).

Así mismo, DBB es capaz de utilizar oxígeno como aceptor final de electrones (Ito *et al.*, 2002b), lo que lo convierte en sulfato reductores facultativos caracterizando de manera singular a este subgrupo (Ito *et al.*, 2000a). Por lo tanto la formación de microcapas sedimentarias (aerobias/anaerobias) favorece la composición predominante de DBB indicando su adaptabilidad a condiciones adversas de su entorno (Santegoeds *et al.*, 1998), lo que explicaría su abundancia a lo largo de todo el perfil.

#### c. Desulfobacter (DSB) – Subgrupo (4)

Este subgrupo pertenece a la familia Desulfobacteriaceae, conjuntamente con DCC y a diferencia de DSV, DFM y DBB poseen la característica de oxidar un amplio rango de sustratos de forma completa hasta CO<sub>2</sub>. Tanto en **las lagunas de aguas blancas como negras** su relación con los factores fisicoquímicos parece no estar asociado con su abundancia (Anexo 6). En cuanto al requerimiento de materia orgánica DSB parece no estar relacionado directamente con el contenido y disponibilidad de materia orgánica en ambas lagunas ( $0.55 < r > 0.05$ ;  $0.12 < r > 0.9$ , respectivamente).

Por lo tanto, su baja abundancia respecto a los dos anteriores subgrupos podría explicarse por que este subgrupo compite con MA por el mismo sustrato, el acetato, pues se sabe que este subgrupo tiene la capacidad de metabolizar con mayor habilidad el mismo ya que posee toda la maquinaria funcional para realizar la fijación de carbono a través del ciclo del ácido cítrico (Balows *et al.*, 1994). Otros estudios (Sass *et al.*, 1997; Luna, 2005) observaron que las secciones intermedias y más profundas del perfil favorecen la abundancia de este grupo. Sin embargo en nuestro estudio tanto su distribución como su abundancia presento un patrón homogéneo en todo el perfil, que podría explicarse por la presencia de subgrupos de

SRB oxidadoras incompletas tales como DSV, DBB y DFM, que degradan sus sustratos (lactato, etanol, propionato, ácidos grasos) hasta acetato, mismo que es utilizado por DSB como fuente de energía hasta la oxidación completa a CO<sub>2</sub>, lo que por otra parte explicaría el patrón similar en cuanto a su distribución y abundancia de DSB con estos subgrupos de oxidadores incompletos de SRB.

Sass *et al.* (1997), observo que en lagunas oligotróficas la utilización de lactato por especies oxidadoras incompletas de SRB dominan con un consecuente aumento relativo en la utilización del acetato por especies oxidadoras completas de SRB (DSB y DCC) con el incremento de la profundidad, lo que a su vez podría explicar la abundancia de DSB y DCC en ciertos puntos intermedios y profundos en el perfil tanto de las lagunas de aguas blancas como de aguas negras (Gráfica 4).

#### **d. Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina (DCC) – Subgrupo (5)**

Este subgrupo incluye a tres géneros estructuralmente diferentes, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* y *Desulfonema*, comparte estrecha relación con la familia Desulfobacteriaceae y por ende con los géneros *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* y de manera más distante con *Desulfobulbus*. Este subgrupo al igual que el anterior posee la característica de oxidar un amplio rango de sustratos de forma completa, en especial acetato. No obstante, la abundancia de DCC tanto en **las lagunas de aguas blancas y negras** parece no estar asociado a factores fisicoquímicos y geoquímicos propias de estas lagunas (Anexo 6), ya que su distribución y abundancia se presentó variable a lo largo de todo el perfil con un patrón similar al observado para DSB, lo cual podría explicarse por que ambos grupos oxidan completamente acetato, por lo tanto llegarían a establecer relaciones de competitividad por el mismo sustrato y cooperatividad con los otros subgrupos de SRB, además existiría la posible relación sintrófica con otras comunidades microbianas como las MA (Thomsen *et al.*, 2001). Por otra parte, la ausencia de este subgrupo a los 7 cm de profundidad en Río Viejo (CEN y DEM), se explicaría por la relación existente de este subgrupo con otros subgrupos de SRB y MA que compiten posiblemente de manera más eficiente por el mismo sustrato (acetato) en este punto. Además, cabe mencionar que el género *Desulfonema* parece tener cierta afinidad por ambientes salinos, de manera semejante a DSB y DBM, por lo que existen razones para creer que la distribución de DCC

en ambientes continentales está más relacionada a los géneros *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* (Fukui *et al.*, 1999).

#### e. **Desulfovibrio-Desulfomicrobium – subgrupo (6)**

Este subgrupo que se encuentra dentro de la familia Desulfovibrionaceae incluye a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*. Del mismo modo que DSB y DCC este subgrupo parece no estar asociado a los parámetros fisicoquímicos y geoquímicos (Anexo 6), a excepción de los 4 a 7 cm en La Granja (CEN), donde el pH ligeramente alcalino junto con el Eh oxidativo parecen favorecer su abundancia, algo similar ocurrió en San Gregorio (DEM) donde el pH ligeramente ácido junto con el Eh oxidativo parecen favorecer su abundancia a lo largo del perfil, sugiriendo que un Eh oxidativo o ligeramente reductor favorecen su abundancia. Lo que podría explicar la abundancia de este subgrupo en ambos tipos de lagunas.

Su distribución en todas las lagunas presenta un patrón similar al observado anteriormente para DFM y DCC, ya que aprovechan los mismos sustratos (Gráfica 4), del mismo modo se caracteriza por oxidar de manera incompleta sustratos tales como lactato, etanol, piruvato e hidrogeno (Jorgensen, 1991; Bak y Pfenning, 1991; Voordoow *et al.*, 1995) generando acetato como producto final de la fermentación. Además, en ausencia de sulfato la oxidación incompleta del lactato conduce a la formación de hidrogeno (Madigan *et al.*, 1999; Balows *et al.*, 1995), por lo tanto este subgrupo podría favorecer al desarrollo de MA, que aprovechan tanto el acetato como el hidrogeno producido por DSV. Por otra parte su presencia a lo largo de todo el perfil al igual que en otros estudios sugiere que DSV tiene la capacidad para tolerar el oxígeno y en algunos casos incluso consumirlo (Zinkevich y Beech, 2000; Loubinoux *et al.*, 2002, Dolla *et al.*, 2006) lo que conlleva a su amplia distribución en diversos hábitats.

Aunque varios estudios (Jorgensen, 1991; Bak y Pfenning, 1991; Devereux *et al.*, 1996; Trimmer *et al.*, 1997; King *et al.*, 2002) señalan que DSV se encuentra en mayor proporción y ampliamente distribuido. En contraste, este estudio encontró a DSV como el subgrupo de SRB menos abundante en todas las lagunas estudiadas, lo que sugiere que el lactato y otros sustratos utilizados por este subgrupo son rápidamente consumidos, probablemente por

otras SRB tales como DFM y DBB que resultaron ser más abundantes. Además, la abundancia de DSV en otros estudios se explica por la especificidad de la sonda DSV687 que detecta a este subgrupo pero también a microorganismos correspondientes del grupo Geobacteraceae (Ionergan *et al.*, 1996; Sahm *et al.*, 1999) lo que conduce a una sobre estimación en la abundancia de DSV. Así mismo, la enorme diversidad de DSV ha hecho difícil el diseño y uso de marcadores moleculares específicos basado en el 16S rRNA para su detección en los distintos ecosistemas (Daly *et al.*, 2000)

### 7.6.2. Distribución y abundancia de la comunidad de MA

Las MA pertenecen al dominio arquea (Woese *et al.*, 1978) y al reino Euryarchaeotaea (Woese *et al.*, 1990; Boone *et al.*, 1993) y pueden utilizar acetato, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, formato y/o otras fuentes de carbono tales como el metanol, metiltioles y metilaminas como substratos de energía.

Otros estudios (Namsaraev y Dulov, 1995; Thebrath *et al.*, 1993) señalan que si bien la sulfato reducción es dominante sobre la metanogénesis en sedimentos de aguas marinas, contrario a lo observado en sedimentos de aguas dulces donde la metanogénesis es el proceso dominante ya que las bajas concentraciones de sulfato favorecen más a las poblaciones de MA que a las SRB, lo que explicaría la distribución y abundancia de los tres grupos de MA y del dominio arquea en todo el perfil de la lagunas estudiadas.

#### a. Orden Methanococcales (MC)

Este orden se caracteriza por ser capaz de utilizar hidrogeno y formato como donadores de electrones, oxidando el hidrogeno hasta reducirlo a CO<sub>2</sub> y son conocidos como **hidrogenótrofos**. Su abundancia y distribución parecen no estar asociada con los factores fisicoquímicos y geoquímicos (Anexo 6). No obstante, este grupo es el mas abundante en las lagunas de aguas negras comparado con las lagunas de aguas blancas, que probablemente se explique mas que por la materia orgánica rica de estas lagunas por la presencia de otras comunidades microbianas que juegan un rol importante en el desarrollo del mismo, por lo tanto la ausencia de subgrupos de SRB tales como DBB, DSB, DCC y DSV podría explicar la

ausencia tanto de MC, MG y MSMX a los 7 cm de profundidad en Río Viejo (CEN y DEM), debido a la interacción sintrofica de ambas comunidades microbianas.

#### **b. Orden methanomicrobiales (MG)**

Este orden al igual que el anterior se caracteriza por ser **hidrogenótrofos**. Por lo que su presencia en lagunas de aguas negras podría explicarse al igual que MC por la presencia de otras comunidades microbianas que favorecen su desarrollo. Además, una gran proporción de Methanomicrobiales se habían encontrado en sedimentos de aguas dulces o acuíferos de aguas subterráneas. Falz *et al* (1999) detecto dos cluster principales relacionados *M. concilii* y protozoarios endosimbiontes (orden Methanomicrobiales).

Kim *et al.*, había considerado que el pH podría influir sobre la actividad metanogénica, ya que regula la producción de H<sub>2</sub> anaerobio en los sedimentos y que puede ser consumida rápidamente por la población de MA. Es así que la distribución y abundancia de MG podría estar asociada con el pH ligeramente ácido de las lagunas de aguas negras ( $0.5 < r > -0.60$ ) (Gráfica 2 y 5) (Anexo 6), ya que se reporto producción eficiente de hidrogeno a pH 5 (Lay, *et al.*, 2000), mientras que un pH mas elevado o mas bajo que este disminuye la producción de hidrogeno e inclusive su producción se encuentra ausente a pH 4, probablemente por que la actividad de la hidrogenasa puede ser afectada a pH bajos (Lay, 2001; Dabrock *et al.*, 1992). Esto conlleva a sugerir que las MA consumidoras de hidrogeno como MC y MG (hidrogenótrofas) son más tolerantes a condiciones acidas que MA consumidoras de acetato como MSMX (acetótrofas) (Kim *et al.*, 2003), lo que justificaría la abundancia de MC y MG en lagunas de aguas negras que reportaron un pH ligeramente ácido.

#### **c. Orden Methanosarcinales (MSMX)**

Los miembros de este orden son metanógenas mesofílicas o termofílicas utilizan principalmente acetato para producir metano (Boone *et al.*, 2001), es decir que son **acetotrófas**. También pueden utilizar el grupo metil del metanol, metilaminas o dimetilsulfuros para producir metano, el hidrogeno también es utilizado como un donador de electrones externo. Los miembros de este orden son metabólicamente y fisiológicamente las mas versátiles metanógenas. Solo las especies de Methanosarcina poseen las tres vías

metabólicas para la metanogénesis. Se ha reportado la presencia de este orden tanto en sedimentos de aguas marinas como de aguas dulces (Zinder, 1993).

Este grupo al igual que los otros grupos no muestran correlación con los datos fisicoquímicos. Sin embargo, la razón variable de C/N en ambos tipos de lagunas (aguas blancas y negras) sugiere que la mineralización de la materia orgánica probablemente genere una elevada cantidad de metabolitos que podrían actuar como catalizadores o inhibidores de la actividad metanogénica.

Por otra parte, si bien las metanógenas son extremadamente sensibles al oxígeno bajo condiciones de laboratorio y son capaces de morir aun por concentraciones bajas de  $O_2$ . Interesantemente se encontró un operón en *Metanosarcina acetivorans* homólogo al citocromo *d* oxidasa de *E. coli* (Galagan *et al.*, 2006). La citocromo *d* oxidasa es una enzima importante en la respiración dependiente de  $O_2$  en *E. coli* (Cotter *et al.*, 1997). Por lo que el rol primario de la citocromo *d* oxidasa en *M. acetivorans* sugiere que juega un rol en la protección de la toxicidad por el oxígeno en numerosos organismos, presumiblemente por el consumo de  $O_2$  o por la disminución en su concentración (Cotter *et al.*, 1997; Duwat *et al.*, 2001; Endley *et al.*, 2001). Tal rol protector por lo tanto es posible en *M. acetivorans*. Además, *cydAB*, dos superóxido dismutasa y una superóxido reductasa y una catalasa han sido identificadas y están involucradas en la protección del oxígeno (Galagan *et al.*, 2006). Por otra parte aunque se reportó a DBB como el subgrupo de SRB más abundante en las lagunas de aguas negras, no tiene la capacidad de oxidar acetato, mientras que MSMX aprovecha la disponibilidad del mismo, compitiendo con las poblaciones de DCC y DSB por el mismo sustrato, dominando MSMX sobre DSB y DCC (Anexo 6)

### **7.7. Interacción y ecología de las comunidades de SRB y MA**

En este estudio se detectaron a cinco subgrupos de SRB y tres órdenes de MA, los cuales se hallaron presentes a lo largo del perfil en todas las lagunas, con diferencias comunes en ciertos puntos (Gráfica 4 y 5) que sugieren procesos de interacción entre las mismas. Una de estas interacciones características entre las SRB y MA es la sintrofia (comer juntos) que involucra que estos organismos compitan por sustratos comunes tales como acetato e hidrógeno en la mineralización de la materia orgánica y por lo tanto, jueguen un rol

fundamental en el funcionamiento global de los ciclos biogeoquímicos (Bryant *et al.*, 1977; Loveley y Klug, 1983; Schönheit *et al.*, 1982; Grabowski *et al.*, 2005). Si bien las SRB forman un grupo versátil de organismos que utilizan una amplia variedad de aceptores de electrones y fuentes de carbono, los mismos pueden ser utilizados por otras comunidades microbianas como las MA. Así la distribución y abundancia de los diferentes grupos de SRB y MA probablemente se expliquen por su interacción sintrófica. La distribución tanto de SRB y MA en todo el perfil sugiere que los sustratos utilizados por ambas comunidades microbianas se encuentran distribuidos heterogéneamente a lo largo de todo el perfil. Las SRB utilizan una variedad de sustratos en lugar de consumir un único sustrato como donador de electrones, lo cual parece ser procedente solo en habitats naturales.

En el presente estudio se encontró a DSV, DBB y DFM que tienen la capacidad de oxidar sustratos orgánicos (lactato, propionato, etanol, hidrogeno, etc.) incompletamente hasta acetato, el cual a su vez puede ser utilizado por DSB y DCC que son capaces de oxidar el acetato hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ . Sin embargo, como la concentración de sulfato es limitante en este tipo de lagunas, el acetato es usualmente degradado vía metanogénica por MSMX, (Hadas y Pinkas, 1995; Nüsslein *et al.*, 2001), es decir, que MSMX consume mucho mejor el acetato que las SRB oxidadoras completas en sedimentos de aguas dulces, observándose en este estudio la dominancia metabólica de MSMX sobre las SRB oxidadoras completas (DSB y DCC) en las lagunas de aguas blancas (Anexo 7). Por otra parte, el  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  proveniente de la oxidación completa del acetato por las SRB conjuntamente con el proveniente de la fermentación primaria de la materia orgánica, puede ser consumido tanto por las SRB oxidadoras incompletas como por las MA hidrogenótrofas, es decir, los grupos MC y MG que utilizan  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  para producir metano. Aunque en las lagunas de aguas negras se observo la abundancia de DBB y MG, no se observo una dominancia metabólica de MG y MC sobre las oxidadoras incompletas de SRB (DFM, DBB y DSV) (Anexo 7), lo que sugiere que ambas coexisten probablemente compartiendo sustratos comunes y no-comunes.

Un experimento realizado en quimiostato a concentraciones limitantes de sulfato (Laabbriej *et al.*, 1984), mostró que *Desulfobacter postgatei* que utiliza acetato como fuente de energía resulta ser un pobre competidor por el sulfato disponible frente a *Desulfobulbus propionicus* y *Desulfovibrio baculatus* los cuales utilizan propionato e hidrogeno como fuente de energía, respectivamente. Como las lagunas estudiadas son de aguas dulces, es de esperarse que la

concentración de sulfato sea limitante en este tipo de lagunas (Holmer y Storkholm, 2001), por lo tanto podría esperarse que el propionato e hidrogeno puedan ser preferentemente utilizados por SRB oxidadoras incompletas como DSV, DFM y DBB generando acetato como producto final. Por otra parte cabe mencionar que las MA no son capaces de convertir el butirato o propionato a metano razón por la cual deben establecer un consorcio con las SRB que utilizan estos substratos y que a su vez generan acetato e hidrogeno los cuales son utilizados por MA para la producción de metano (metanogénesis). Por otra parte, las especies oxidadoras incompletas DBB y DFM generalmente crecen mucho mas rápido que los oxidadores completos DSB y DCC, lo que explicaría la abundancia de DFM en lagunas de aguas blancas y DBB en lagunas de aguas negras (Gráfica 6). Cabe mencionar que DBB no presenta relación sintrófica con metanógenas, lo cual remarca una característica importante de este subgrupo (Harmsen *et al.*, 1996). No obstante, el desarrollo de DBB podría ser independiente pero indirectamente estimulado tanto por la actividad de comunidades metanogénicas como por otros subgrupos de SRB. Del mismo modo, la abundancia de MSMX y MG observada en este estudio había sido reportado en otros estudios en sedimentos de aguas dulces (Glissmann *et al.*, 2004; Go *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2003), esta frecuente posibilidad de ocurrencia entre MSMX y MG sugieren que son una eficiente pareja sintrófica en la degradación completa de materia orgánica en sedimentos de aguas dulces (Schwarz *et al.*, 2006).

Por otra parte es importante considerar que las sondas utilizados para detectar al subgrupo DSV, abarca un amplio rango de especies en el orden Desulfobivibrionales, lo que en muchos casos explica la abundancia de DSV en otros estudios, en contraste a este estudio. Sin embargo, cabe señalar que la detección de Geobacteraceae por esta sonda podría causar la sobreestimación de DSV. Además debe considerarse que las sondas se diseñaron a partir de cultivos puros y otras secuencias conocidas, por lo que la baja abundancia de DSV en este estudio podría sugerir la existencia de nuevas especies de DSV. Un hecho semejante se observa con la sonda para el subgrupo DCC que pueden detectar cuatro géneros conocidos de SRB además de los propios del subgrupo. En contraste, las sondas para los subgrupos DBB, DFM y DSB son mucho más específicos para sus géneros correspondientes (Desulfobulbus, Desulfotomaculum y Desulfobacter; Loy *et al.*, 2002). Por lo tanto para disponer de una buena información taxonómica es necesario obtener sondas propias a partir de muestras provenientes del lugar de estudio, ya que los utilizados en este estudio si bien

detectan a grupos generales de SRB y MA no podrían reflejar la verdadera distribución y abundancia de las mismas, que además conduce a la probabilidad de encontrar nuevas especies de SRB y MA.

## 8. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se caracterizaron los parámetros fisicoquímicos y geoquímicos de perfiles sedimentarios de lagunas de aguas blancas y negras, observándose diferencias significativas en relación al contenido de carbono y nitrógeno entre las lagunas de aguas blancas y negras ( $r=0.33$  para carbono y  $r=0.29$  para nitrógeno). En **las lagunas de aguas blancas** se observó diferencias entre sitios de muestreo, así el sitio DEM presentó mayor contenido de agua, pH ligeramente más bajos y Eh más reductivos, mayor contenido de carbono y nitrógeno y una mayor razón C/N en relación al observado en el sitio CEN. En contraste, **las lagunas de aguas negras** el sitio DEM presenta menor contenido en agua, pH ligeramente más ácidos y un Eh con tendencia oxidativa, contenido de carbono y nitrógeno más bajo con relación al sitio CEN, siendo la razón C/N más variable (mayor en Chitiwara (CEN) y San Gregorio (DEM))
- Se logró la optimización de métodos de extracción de RNA así como también de las condiciones de hibridización dot-blot. El método (Fleming-CTAB) mostró una buena eficiencia para extraer RNA, la cantidad del 16S rRNA extraído varió entre 0.5 a 0.1 ug de RNA/g de sedimento en las lagunas de aguas blancas y de 4 a 12 ug de RNA/g de sedimento en las lagunas de aguas negras. Del mismo modo la optimización de las condiciones de hibridización tales como la temperatura de hibridización y concentración sales (estringencia) permitieron evaluar la especificidad de cada una de las sondas empleadas a través de ácidos nucleicos provenientes de cepas de referencia.
- La distribución y abundancia de los dominios, mostró a arquea como uno de los dominios más abundantes, seguido por eucaria y bacteria, donde la última mostró un patrón homogéneo en cuanto a su distribución y abundancia. Por otra parte, las lagunas de aguas negras presentaron mayor abundancia de SRB y MA que las lagunas de aguas blancas observándose diferencias significativas con valores de  $0.50 < r > 0.11$  para SRB y  $-0.65 < r > 0.04$  para MA. Del mismo modo, se observaron diferencias significativas entre los sitios de muestreo CEN y DEM. Observándose mayor abundancia de SRB y MA en el sitio DEM (con vegetación) respecto a CEN (sin vegetación).

- La correlación entre los grupos de SRB y MA y las características fisicoquímicas y geoquímicas de cada perfil mostró que el potencial oxido reductor presento una asociación con los subgrupos de SRB, observándose que DFM se ve más favorecido por condiciones reductoras ( $0.76 < r > 0.55$ ), mientras que DBB por condiciones oxidativas o ligeramente reductoras ( $-0.90 < r > 0.1$ ). La razón C/N en las lagunas de aguas negras tiende a ser mayor comparado con las lagunas de aguas blancas, sin embargo su elevado contenido orgánico (%C y %N) favorece la abundancia de las comunidades microbianas de SRB y MA en estas lagunas.
- Se determino la distribución y abundancia relativa de las comunidades de SRB y MA en todos los perfiles sedimentarios de las lagunas en estudio, encontrándose en las lagunas de aguas blancas a DFM y MSMX como los grupos más abundantes mientras que en las lagunas de aguas negras se observo a DBB y MG. La abundancia de DBB y DFM en estas lagunas sugiere que se realiza una oxidación incompleta de sustratos (lactato, propionato, etanol, hidrogeno, etc) hasta acetato, el cual a su vez es usualmente utilizado vía metanogénica por MSMX para la producción de metano, observándose la dominancia metabólica de MSMX sobre las SRB oxidadores completas (DSB y DCC) en las lagunas de aguas blancas, lo que sugiere que en sedimentos de aguas dulces MSMX consume mucho mejor el acetato que las SRB oxidadoras completas.
- Por otra parte, el H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> proveniente de la oxidación completa del acetato por las SRB conjuntamente con el proveniente de la fermentación primaria de la materia orgánica puede ser consumido tanto por las SRB oxidadoras incompletas como por las MC y MG que utilizan H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> para producir metano. Aunque en las lagunas de aguas negras se observo la abundancia de DBB y MG, no se observo una dominancia metabólica de MG y MC sobre las oxidadoras incompletas de SRB (DFM, DBB y DSV), lo que sugiere que ambas comunidades coexisten probablemente compartiendo sustratos comunes y no-comunes.
- En síntesis, las características fisicoquímicas y geoquímicas de cada tipo de laguna (aguas blancas y negras), mostraron diferencias significativas de la distribución y abundancia de SRB y MA, siendo más favorable en las lagunas de aguas negras. Del mismo modo, la heterogeneidad en la abundancia y distribución de las comunidades

microbianas de SRB y MA se ven asociadas a las características propias de su entorno, así el sitio DEM (con vegetación) mostró mayor abundancia y distribución comparado con el sitio CEN (libre de vegetación), mostrando diferencias significativas entre ambos sitios de muestreo.

## 9. RECOMENDACIONES

Las muestras ambientales pueden variar significativamente en el contenido inorgánico y orgánico, por lo que los protocolos de lisis y extracción empleados para una directa extracción de rRNA de muestras ambientales deben considerar estos factores y puede ser necesario que sea modificado para ambientes específicos y para el tipo de estudio involucrado.

Para poder indagar más sobre la interacción entre SRB y MA en estos ambientes, es recomendable medir procesos metabólicos de sulfato reducción y metanogénesis, para encontrar una interacción más real y específica entre ambas comunidades.

Para el estudio de comunidades microbianas en ambientes naturales, es recomendable utilizar sondas de oligonucleótidos sintetizadas en base a estudios previos, para explorar aún mas sobre la diversidad de las especies propias del lugar e incluso sugerir la aparición de nuevas. Además se debe determinar la filogenia propia de las SRB y MA estudiadas en esta región, mediante la secuenciación del 16S rDNA.

## 10. REFERENCIAS

- Acha, D. 2004. Bacterias sulfato reductoras en la rizosfera de macrofitas de una laguna de la llanura de inundacion del rio Beni, Rio Viejo. Tesis para optar al Titulo de Licenciatura en Biologia. Universidad Mayor de San Andres, La Paz. 124 pp.
- Abed, R.M.M., et al. 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied Environmental Microbiology* 68: 1674 -1683.
- Alm, E. & Stahl, D. 2000. Critical factors influencing the recovery and integrity of rRNA extracted from environmental samples: use of an optimized protocol to measure depthrelated biomass distribution in freshwater sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 153 - 162.
- Alvarez, R., Aspe, E. & Urrutia, H. 2000. Colonization of Supports by Methanogenic and Sulfate Reducing Bacteria in Anaerobic Filter-Type Reactors. *Revista Latino Americana de Microbiologia*, 42: 177 - 180.
- Ambrosetti W., Barbanti L., Sala N. 2003. Residence time and physical processes in lakes. *J. Limnology*. 62: 1 – 15.
- Amman, R., Stromley J., Devereux R., Key & Stahl, D. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environmental Microbiology*. 58: 614 – 623.
- Amman, R., Ludwig, W. & Scheleifer, K. 1995. Phylogenic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143 – 169.
- Anderson, M.R., D.A Scruton, U.P. Williams & J.F. Payne. 1995. Mercury in fish in the Smallwood Reservoir, Labrador, twenty one years after impoundment. *Water, Air and Soil Pollution* 80: 927 – 930.
- Archer, D. B., & G. E. Powell. 1985. Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen. *Arch. Microbiol.* 141:133 – 137.
- Arteaga, D. 2004. Identificacion de BSR en sedimentos de tres lagunas de inundacion del rio Beni, Bolivia. Pasantia de investigacion. La Paz- Bolivia.
- Bak, F., & Cypionka H. 1987. A novel type of energy metabolims involving fermentation of inorganic sulphur compounds. *Nature*, 326, 891 – 892.
- Bak, F., & Pfennig, N. 1991. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodimutans* sp. nov. By disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Archives in Microbiology*, 147:184 - 189.

- Bahr, M., Crump, B., Klepac-Ceraj, V., Teske, A., Sogin, M. & Hobbie, J. 2005. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environmental Microbiology*, 7(8): 1175 – 1185.
- Balows, A. 1991. *Manual of Clinical Microbiology* (6<sup>a</sup> ed). American Society of Microbiology. Washington.
- Balows, A, G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K. Schleifer. 1992. *The Prokaryotes*. Second edition. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications Volume 4. Chapter 183. Friedrich Widdel y Friedhelm Bak. pg. 3352 – 3376.
- Banta T., Holmer M., Jensen H. & Kristensen E. 1999. Effects of two polychaete worms, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*, on aerobic and anaerobic decomposition in a sandy marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology*. 19: 189 – 204.
- Barton, L. & Tomei, F. 1995. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. Pp. 1 – 22. En: L. Barton. *SULFATE-REDUCING BACTERIA*. Plenum Press, New York.
- Baumgartner, L., Reid, R., Dupraz, C., Decho, A., Buckley, D., Spear, I., Przekop, . & Visscher, P. 2006. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, 185: 131 – 145.
- Benoit, J., Gilmour, C. & Mason, P. 2001. Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Applied and Environmental Microbiology*, 67.
- Bintrim S. 1997 *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 94: 277 – 282.
- Blum, J. E., & R. Bartha. 1980. Effects of salinity on methylation of mercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 404 – 408.
- Brie, C., Moreira, D. & Lopez . Garcia, P. 2007. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, 158: 213 – 227.
- Bononi F., Kurtz Jr. D.M. y Cui. 1996. Ferroxidase activity of recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. *JIBC*. 1: 67 – 62.
- Boone, D. & Whitman, B. 1988. Proposal of minimal standards for describing new taxa of methanogenic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 212 – 219.

- Boone, D. R., Whitman, W. B. & Rouvie' re, P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 35-80. Edited by J. G. Ferry. New York & London: Chapman & Hall.
- Boone, D. R., & R. W. Castenholz. 2001. *The Archaea and the deeply branching phototrophic bacteria*, 2nd ed., vol. 1.: Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Bosatta, E., & Agren, G.I., 1999. Soil organic matter quality interpreted thermodynamically. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1889 – 1891.
- Bourgoin, L.M., Quiroga, I., Guyot, J. L., & Malm O. 1999. Mercury Pollution in the Upper Beni River Amazonian Basin: Bolivia. *Ambio*, 28: 302 – 306.
- Bryant M., Campbell L., Reddy A. & Crabill R. 1977. Growth of desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 33: 1162 – 1169.
- Buhring, S., Elvert, M. & Witte, W. 2005. The microbial community structure of different permeable sandy sediments characterized by the investigation of bacterial fatty acids and fluorescence in situ hybridization. *Environmental Microbiology*, 7(2): 281 – 293.
- Bult, C., White, O., Olsen, G. & 37 other authors 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273: 1058 – 1073.
- Canfield D. E. & Des Marais D.J. 1991. Aerobic sulfate reduction in microbial mats. *Science Reprint Series*, 251, 1471 – 1473.
- Capone D. G. & Kiene R. P. 1988. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnology and Oceanography*, 33, 725 – 749.
- Castro, H., Williams, N. & Ogram, A. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 1 – 9.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113 – 116.
- Chang, Y., Peacock, D., Long, E., Stephen, R. McKinley, P., Macnaughton, J., Hussain, A., Saxton, M. & White, D. 2001. Diversity and Characterization of Sulfate-Reducing Bacterian in Groundwater at a Uranium Mill Tailings Site. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3149 – 3160.
- Cheng, W. & Konisky, J. 1993. Characterization of a membrane-associated ATPase from *Methanococcus voltae*, a methanogenic member of the Archaea. *Journal of Bacteriology*, 175: 5677 – 5682.

- Chauchan, A., Reddy, K. & Ogram, A. 2006. Syntrophic-archaeal associations in a nutrient-impacted freshwater marsh. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 73 – 84.
- Colleran E., Finnegan S & Lens P. 1995. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek*. 67: 29 – 46.
- Compeau, G., & Bartha, R. 1984. Methylation and Demethylation of Mercury Under Controlled Redox, pH, and Salinity Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 48:1203 – 1207.
- Compeau, G., & Bartha, R. 1985. Sulfate reducing bacteria: principal methylators of Hg in anoxic estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 498 – 502.
- Conrad, R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O and NO). *Microbiology Reviews*, 60: 609 – 640.
- Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microb. Ecol.* 28:193 – 202.
- Cotter, P.A., Melville, S.B., Albrecht, J.A., & Gunsalus, R.P. 1997. Aerobic regulation of cytochrome d oxidase (cydAB) operon expression in *Escherichia coli*: Roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol. Microbiol.* 25: 605 - 615.
- Cypionka, H., Widdel, F. & Pfennig, N. 1985. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 39 - 45.
- Cypionka, H. 1994. Sulfate transport. *Methods of Enzymology*, 243: 3 – 14.
- Cypionka, H., 2000. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 827 – 848.
- Daly K., Sharp, R. & McCarthy, A. 2000. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology*, 146: 1693 - 1705.
- Dannenber S., Kroder M., Dilling W., & Cypionka H. 1992. Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiology*. 158: 93 - 99.
- Danovaro R., Marralle D., Cella Crone N., Dellanno A. & Fabiano M. 1998. Heterotrophic nanoflagellates, bacteria and labile organic compounds in continental shelf and deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean. *Microbial Ecology*. 35: 244 – 255.

- Deming J. & Baross A. 1993. The early diagenesis of organic matter: bacterial activity. *Organic Geochemistry*. Plenum Press, New York, pp. 119 -144.
- Deplancke B., Hristova K., Oakley A., McCracken V. J., Aminov R., Mackie I. & Gaskin H. 2000. Molecular ecological analysis of the Succession and diversity of sulfate reducing bacteria in the mouse gastrointestinal track. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (5): 2166 - 2174.
- Devereux, R., Kane, M., Winfrey, J. & Stahl, D. 1992. Genus- and group specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Systematics and Applied Microbiology*, 15: 601 – 609.
- Devereux R., Winfrey, M., Winfrey, J. & Stahl, D. 1996. Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 20: 23 - 31.
- Detmers, J., Bruchert, V., Habicht, K. & Kuever, K. 2001. Diversity of sulfur isotope fraction by sulfate reducing prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 888 . 894.
- D' Hondt S, Jorgensen B & Miller D. 2004. Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science* 306: 2216 - 2221.
- Dilling, W. & Cypionka, H. 1990. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 71: 123 - 128.
- Dolla ., Marjorie Fournier, Zorah Dermoun. 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*.
- Dojka, M.A., Hugenholz, P., Haack, S.K., & Pace, N.R. 1998. Microbial diversity in hydrocarbon- and chlorinated solvent- contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 64: 3869 - 3877.
- Dos Santos, W.G., Pacheco, I., Liu, M.-Y., Teixeira, M., Xavier, A.V., LeGall, J., 2000. Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 182, 796 - 804.
- Earl J., Hall, G., Pickup, R.W., Ritchie, D. & Edwards. 2003. Analysis of methanogen diversity in a hyperutrophic lake using PCR-RFLP analysis of *mcr* sequences. *Microbial Ecology* 46: 270 - 278.
- Edwards L., Liller K., Timms-Wilson H., Thompson P., Cooper I. 2001. Characterization of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake. *FEMS Microbiology*. 35: 295 - 304.

- Egli, T. 1995. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Adv. Microb. Ecol.* 14, 305 - 386.
- Embley, T. M., and Stackebrandt, E. 1996. The use of 16S ribosomal RNA sequence in microbial ecology, p. 39 - 62. In R. W. Pickup and J. R. Saunders (ed.), *Molecular approaches to environmental microbiology*. Ellis Horwood Ltd., New York.
- Endley, S., McMurray, D., y Ficht, T.A. 2001. Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *J. Bacteriol.* 183: 2454 - 2462.
- Eschemann, A., Kuhl, M. & Cypionka, H. 1999. Aerotaxis in *Desulfovibrio*. *Environmental Microbiology*, 1: 489 - 494.
- Farrelly, V., Rainey, F. & Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2798 - 2801.
- Fauque, G. 1995. Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. p.p. 223 - 226. En L. Barton. *SULFATE-REDUCING BACTERIA*. Plenum Press, New York.
- Felske, A., Engelen, B., Nubel, U. & Backhaus, H. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4162 - 4167.
- Fernades, A., Hollnagel, H., Lima, H. & Fioravanti, R. 2007. Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Pereque Beach, Guarujá (SP), Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 921 - 927.
- Festl, 1986. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 331 - 335.
- Ficker M., Krastel K., Orlicky S. & Edwards E. 1999. Molecular characterization of a toluenedegrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12): 5576 - 5586.
- Finster, K., W. Liesack, & B. Thamdrup. 1998. Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:119 -125.
- Fisher H., Wanner C & Pusch M. 2002. Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry*. 61: 37 - 55.

- Fleming, J., Yao, W-H. & Saylor, G. 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: Application to pure culture and soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3698 - 3706.
- Foti, M., Sorokin, D., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E., Pimenov, N., Kuenen, J. & Muyzer, G. 2007. Diversity, Activity, and Abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Saline and Hypersaline Soda Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7): 2093 - 2100.
- Fortin, D., M. Roy, Rioux P & Thibault P. 2000. Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au an Cu-Zn mine tailings. *FEMS Microbiology Ecology*. 33 : 197 - 208.
- Fournier, M., Aubert, C., Dermoun, A., Durand, M-C., Moinier, D. & Dolla, A. 2006. Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis. *Biochimie*, 88: 85 - 94.
- Fry, N., Fredrickson, J., Fishbain, S., Wagner, M. & Stahl, D. 1997. Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1498 - 1504.
- Fukui, M., Teske, A., Aamus, B., Muyzer, G. & Widdel, F. 1999. Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Archives of Microbiology*, 172: 193 - 203.
- Galand, P.E., Saarnio, S., Fritze, H., et al. 2002. Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 441- 449.
- Galand P. E. 2004. Methanogenic archaea in boreal peatlands. Academic Dissertation in General Microbiology, Helsinki. 30 pp.
- Garcia J., Patel, B. & Ollivier, B. 2000. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe*, 6: 205 - 226.
- Gachter R., Meyer S & Mares A. 1988. contribution of bacteria to release and fixation of phosphorus in lake sediments. *Limnology Oceanography*. 33: 1542 - 1558.
- Gilmour, C.C. y E.A. Henry. 1991. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environ. Pollut.* 71: 131.
- Gilmour C.C., Henry E.A., Mitchell R. 1992. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environmental Science and Technology*, 26: 2281 - 2287.

- Gilmour, C.C., G.S. Ridel, M.C. Ederington, J.T. Bell, J.M. Benoit, G.A. Gill y M.C. Stordal. 1998. Methylmercury concentrations and production rates across a trophic gradient in the northern Everglades. *Biogeochemistry*. 40: 327 - 345.
- Glissmann K., Chin K., Casper P. & Conrad R. 2004. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: Effect of temperature. *Microbiology Ecology*. 48: 389 - 399.
- Go Y., Han S., Lee I. & Ahn T. 2000. Diversity of the domain Archaea as determined by 16S rRNA gene analysis in the sediments of Lake Soyang. *Arch. Hydrobiology*. 149:459 - 466.
- Grabowski A., Nercissian O., Fayolle F., Blanchet D., Jeanthon C. 2005. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 427 - 443.
- Gregory SV., Swanson FJ., McKee WA., Cummins KW. 1991. An ecosystems perspective of riparian zones: Focus on links between land and water. *Bioscience*. 41: 540 - 551.
- Griffiths, R., Whiteley, A., O'Donnell, A. & Bailey, M. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and RNA based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 5488 - 5491.
- Guimaraes, J. R. D., M. Meili, L. Hylander, E. de Castro E Silva, M. Roulet, J. B. N. Mauro, y R. de Lemos. 2000. Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. *Sci. Total Environ* 261:99 -107.
- Guyot, J.-P. 1986. Role of formate in methanogenesis from xylan by *Cellulomonas* sp. associated with methanogens and *Desulfovibrio vulgaris*: inhibition of the acetate reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:149 - 153.
- Haberman J., Pihu E., Raukas A. 2004. Lake Vortsjärvi. Estonian Encyclopedia Publishers, p. 12-25; 79-87; 114 -139.
- Hackstein Johannes H. P., Stumm Claudius K.. 1994. Methane Production in Terrestrial Arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, No. 12, pp. 5441-5445
- Hadas, R. Pinkas. 1995. Sulfate reduction in the hypolimnion and sediments of Lake Kinneret, Israel, *Freshwater Biol.* 33: 63–72.

- Hahn M. 2006. The microbial diversity of inland waters. *Curr. Opin. Biotechnology*. 17: 256 - 261.
- Haglund, A-L., Lantz, P., Törnblom, E. & Tranvick, L. 2003. Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 46: 31 – 38.
- Hannon GE, Gaillard M-J. 1997. The plant-macrofossil record of past lake-level changes. *Journal of Paleolimnology* 18: 15–28.
- Hao O.J., Chen J.M., Huang L. & Buglass R. L. 1996. Sulfate reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26, 155 – 187.
- Harmsen, H.J., Kengen, H.M., Akkermans, A.D., Stams, A.J., & de Vos, W.M. 1996. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 62: 1656–1663.
- Head, I., Saunders, J. R. & Pickup, R. 1998. Microbial Evolution, Diversity and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganismos. *Microbiol Ecology*, 35: 1 – 21.
- Helland A., Holtan G. & Jorgensen P. 2003. Riverine inputs of organic carbon and nitrogen to Norwegian coastal areas. *Ambio* 32 (6): 412 – 417.
- Hendricks P. 1996. Bacterial biomass, activity and production within the hyporheic zone of a north-temperate stream. *Archaea Hydrobiol.* 136: 467 – 487.
- Hilton B. & Oleszkiewicz J. 1988. Sulphide-induced inhibition of anaerobic digestion. *J. Environ. Eng.* 114: 1377 – 1391.
- Hipp, W.M., Pott, A.S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C., & Trüper, H.G. 1997. Towards the phylogeny of APS reductases and siroheme sulfite reductases in sulfate reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* 143: 2891–2902.
- Hoeler T., Alperin J., Albert B. & Martens S. 2001. Apparent minimum free energy requirements for methanogenic Archaea and sulfate-reducing bacteria in an anoxic marine sediments. *FEMS. Microbiology Ecology*. 38: 33 – 41.
- Holt, J.G. 1993. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Holmer, M. & Storkholm, P. 2001. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments:

- a review. *Freshwater Biology*, 46: 431 – 451.
- Hollibaugh, J.T., Wong, P.S., Bano, N., Pak, S.K., Prager, E.M., & Orrego, C. 2001. Stratification of microbial assemblage in Mono Lake, California, and response to a mixing event. *Hydrobiologia* 466: 45–60.
- Hondeveld B., Bak M. & Duyl F. 1992. Bacterivory by heterotrophic nanoflagellates in marine sediments measured by uptake of fluorescently labeled bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 89: 63 – 71.
- Hordijk C.A., Kaimminga K. & Cappenberg T.E. 1994. Kinetic studies of acetate in freshwater sediments. Use of stable isotopic tracers. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58, 683 – 694.
- Horner-Devine C., Carney M., Bohannon M. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. Lond.* 271: 113 – 122.
- Ibisch, P., Beck, S., Gerkmann, B. & Carretero, A. 2003. Ecorregiones y ecosistemas. Pp. 47 – 59. En: Ibisch, P. & Mérida, G. *Biodiversidad: La riqueza de Bolivia*. Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A. & Harada, H. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 66, 3608 – 3615.
- Ingall E & van Cappelen P. 1990. Relation between sedimentation rate and burial of organic phosphorous and organic carbon in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54: 373 – 386.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S. & Verstraete, W. 1986. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Microbiological aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 580 – 587.
- Ishii K, Mubmann M., Mac Gregor B.J. & Amann R. 2004. An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS. Microbiology Ecology* 50: 203 – 212.
- Ito, T., Nielsen, L., Okabe, S. Watanabe, Y. & Nielsen, P. 2002a. Phylogenetic Identification and Substrate Uptake Patterns of Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting an Oxic-Anoxic Sewer Biofilm Determined by Combining Microautoradiography and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 356

– 364.

- Ito, T., Okabe, S. Satoh, H. & Watanabe, Y. 2002b. Successional Development of Sulfate- Reducing Bacterial Populations and Their Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1392 – 1402.
- Iversen N. & Jorgensen B. 1985. Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate – methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak. *Limnology Oceanography* 30: 944 – 955.
- Jackson, B. & McInerney, M. 2000. Thiosulfate disproportionation by *Desulfotomaculum thermobenzoicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3650 – 3653.
- Janssen, P., Schuhmann A., Bak F & Lisack W. 1996. Disproportionation of inorganic sulphur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* ge. Nov., sp. Nov. *Arch. Microbiology*, 166: 184 – 192.
- Jeanthon, C., L'Haridon S., Reysenback A., Corre E., Vernet M. & Messner P., et al. 1999. *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213T as *Methanococcus fervens* sp. nov. *Syst. Bacteriology* 49: 583 – 589.
- Jones W., Leigh J., Mayer F., Woese R. & Wolfe R. 1983. *Methanococcus jannaschii* sp., nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiology*. 136: 254 – 261.
- Jorgensen, B. 1978. A comparison of method for the quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments. III. Estimation from chemical and bacteriological field data. *Geomicrobiology*, 1: 49 – 64.
- Jorgensen, B. 1982. Mineralización of organic matter in the sea bed the rol of sulfate reduction. *Nature*, 296: 643 – 645.
- Jorgensen, B. 1990. The sulfur cycle of freshwater sediments: Role of thiosulfate. *Limnology and Oceanography*, 35, 1329 – 1342.
- Jorgensen, B. & Bak, F. 1991. Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reductions in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 847– 856.
- Jurgens, G., Lindström, K. & Saano, A. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 803–805
- Jurgens, G., Glöckner, F.-O., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolammi, M. &

- M€unster, U. 2000. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34, 45–56.
- Kaksonen, A., Plumb, J., Franzmann, P & Puhakka, J. 2004. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and containing wastewater. *Microbiology Ecology*, 47: 279 – 289.
- Kane, M., Poulse L., & Stahl. D. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 682 – 686.
- Kandler, O. & Koinig, H. 1998. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Science*, 54: 305 – 308.
- Karr, E., Sattley, M., Rice, M., Jung, D., Madigan, M. & Achenbach, L. 2005. Diversity and distribution of sulphate-reducing bacteria in permanently frozen Lake Fryxell, McMurdo dry valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 6353 – 6359.
- Kajak. Z. 1988. Considerations on benthos abundance in freshwater, its factors and mechanisms. *Internationale Revue des Gesamten Hydrobiologie*. 73: 5 – 19.
- Keith, J. Boyer, J. & De los Reyes, F. 2005. Changes in the rRNA levels of specific microbial groups in activated sludge during simple handling and storage. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 208 – 215.
- Kenglen S., Breidenbach G., Felske A., Stams A., Schraa G y De Vos W. M. 1999. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (6): 2312 – 2316.
- Kent A. & Triplett E. 2002. Microbial communities and their interactions in Soil and Rhizosphere Ecosystems. 56: 211 – 229.
- Kim Y.-H., & E.R. Carraway. 2003. "Dechlorination of Chlorinated Phenols by Zero Valent Zinc." *Environmental Progress* 24(12): 1455-1463.
- King G. M. 1984. Utilization of hydrogen, acetate, and non-competitive substrates by methanogenic bacteria in marine sediments. *Geomicrobiology Journal*, 3, 275 – 306.
- King, J., Saunders, M., Lee, M. & Jahnke, A. 1999. Coupling mercury methylation rates

- to sulfate reduction rates in marine sediments. *Environmental and Toxicology Chemistry*, 18: 1362 – 1369.
- King, J., Kostka, J., Frischer, M. & Saunders, F. 2000. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2430 – 2437.
- King, J., Kostka, J., Frischer, M., Saunders, F. & Jahnke, R. 2001. A quantitative relationship that demonstrates mercury methylation rates in marine sediments are based on the community composition and activity of sulfate-reducing bacteria. *Environmental Science and Technology*, 35: 2491 – 2496.
- King J., Timothy J Albaugh, H. Lee Allen, Marilyn Buford, Boyd R Strain, Phillip Dougherty. 2002. Below-ground carbon input to soil is controlled by nutrient availability and fine root dynamics in loblolly pine. *New Phytologist* 154 (2), 389–398.
- Klenk, H.-P., Clayton, R., Tomb, J.-F. & 48 other authors. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 390: 364 – 370.
- Knoblauch, C., Jorgensen, B. & Harder, J. 1999. Community Size and Metabolic Rates of Psychrophilic Sulfate-Reducing Bacteria in Arctic Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4230 – 4233.
- Koizumi, Y., Takii, S., Nishino, M. & Nakajima, T. 2003. Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 101 – 108.
- Koizumi, Y., Kojima, H. & Fukui, M. 2004. Dominant microbial composition and its vertical distribution in saline meromitic Lake Kaiike (Japan) as revealed by quantitative oligonucleotide probe membrane hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4930 – 4940.
- Köster M. & Meyer-Reil L. 2001. Characterization of carbon and microbial biomass pools in shallow water coastal sediments of the southern Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 214: 25 – 41.
- Krekeler, D., Teske, A. & Cypionka, H. 1998. Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiol Ecology*, 25: 89 – 96.
- Krumholz, L., Harris, H., Tay, T. & Suflita, M. 1999. Characterization of Two Subsurface H<sub>2</sub>- Utilizing Bacteria, *Desulfomicrobium hypogaeum* sp. nov. and

- Acetobacterium psammolithium* sp. nov., and Their Ecological Roles. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2300 – 2306.
- Kuivila, K.M., Murray, J.W. and Devol, A.H. (1989) Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 53, 407–416.
- Laanbroek, H. & Pfennig, N. 1981. Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Archives in Microbiology*, 128: 330 – 335.
- Laanbroek, H. & Veldkamp H. 1982. Microbial interactions in sediment communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 297, 533 – 550.
- Larsen, D.P., Schults, D.W., Malereg, K.W., 1981. Summer internal phosphorus supplies in Shagawa Lake, Minnesota. *Limnol. Oceanogr.* 26, 740–753.
- Lay JJ. 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng* 68:269–278.
- Lay JJ, Lee YJ, Noike T. 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res* 33: 2579–2586.
- Lehman M., Roberto F., Earley D., Bruhn D., Brink S., O'connel S., Delwiche M., y Colwell F. 2001. Attached and unattached bacterial communities in a 120-meter corchole in an acidic, crustallyne rock aquifer. *Applied and Environmental Microbiology.* 67 (5): 2095 – 2106.
- Leloup, J., Quillet, L., Oger, C., Boust, D. & Petit, F. 2004. Molecular quantification fo sulfate-reducing microorganisms (carrying *dsrAB* genes) by competitive PCR in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 207 – 214.
- Li, J-h. Purdy, K., Susumu, T. & Hayashi, H. 1999. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in freshwater lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 31 – 39.
- Lie, T., Clawson, L., Godchaux, W. & Leadbetter, R.. 1999a. Sulfidogenesis from 2- Aminoethanesulfonate (Taurine) Fermentation by a Morphologically Unusual Sulfate- Reducing Bacterium, *Desulforpopalus singaporensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3328 – 3334.
- Lie, T., Godchaux, W. & Leadbetter, R. 1999b. Sulfonates as Terminal Electron Acceptors for Growth of Sulfite-Reducing Bacteria (*Desulfitobacterium* spp.) and Sulfate-

- Reducing Bacteria: Effects of Inhibitors of Sulfidogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4611 – 4617.
- Lindstrom E., Kamst-Van Agterveld P & Zwart G. 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature and lake water retention time. *Applied Environmental Microbiology*. 71: 8201 – 8206.
- Lomans B., Camp H.m Pol A. & Vogels G.D. 1999. Anaerobic versus aerobic degradation of dimethyl sulphide and methanethiol in anoxic freshwater sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 187 – 192.
- Londry K., Fedorak M., y Suflita J.M. 1997. Anaerobic degradation of m-cresol by a sulfate reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (8): 3170 – 3175.
- Loubinoux, J., Bronowicki, P., Pereira, C., Mougengel, L. & Faou, E. 2002. Sulfate-reducing bacteria in human faces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecology*, 40: 107 – 112.
- Lovley D. R. & Klug M.J. 1983. Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Applied Environmental Microbiology*, 45, 1310 – 1315.
- Lovley D. R. & Phillips, E. J. 1992. Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 850 – 856.
- Lovley D. R. & Phillips, E. J. 1994. Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2394-2399.
- Loy A., Lehner A., LeeN., Adamczyk J., Meier H., Ernst J., Schleifer H. & Wagner M. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 5064 -5081.
- Luca, G, Philip, D., Dermoun, Z., Rousset, M. & Verméglio, A. 2001. Reduction of Technetium (VII) by *Desulfovibrio fructosovorans* Is Mediated by the Nickel-Iron Hydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4583 – 4587.
- Lueders T, Chin KJ, Conrad R & Friedrich M. 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol* 3: 194–204.

- Lumpio, H.L., Shenvi, N.V., Summers, A.O., Voordouw, G., Kurtz, D.M., 2001. Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J. Bacteriol.* 183, 101–108.
- Luna, R. 2004. Perfil preliminar de bacterias sulfato-reductoras en sedimentos de laguna “La Granja” (Beni - Bolivia). Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – Bolivia. 103 pp.
- Lundkvist, M., Grue, M., Friend, P. & Flindt, M. 2007. The relative contributions of physical and microbiological factors to cohesive sediment stability. *Continental Shelf Research*, 27: 1143 – 1152.
- Maberly C., 1996. Diel, episodic and seasonal changes in pH and concentrations of inorganic carbon in a productive lake. *Freshwater Biology*. 35: 579 – 598.
- Macalady, J. Mack, L., Nelson, D. & Scow, K. 2000. Sediment Microbial Community Structure and Mercury Methylation in Mercury-Polluted Clear Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1479 – 1488.
- Mac Gregor B., Moser P., Alm E., Neelson H. & Sthal D. 1997. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 1178 – 1181.
- MacGregor, B., Moser, P., Baker, J. Alm, E., Maurer, M., Neelson, H. & Sthal, D. 2001. Seasonal and Spatial Variability in Lake Michigan Sediment Small-Subunit rRNA Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3908 – 3922.
- McCabe D. J. & Gotelli NJ. 2000. Effects of disturbance frequency, intensity and area on assemblages of stream macroinvertebrates. *Oecologia*. 124: 270 – 279.
- Madigan, M. T., A. M. Martinko, & J. Parker. 2000. *Brock's Biology of Microorganisms*, 9th ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Malm, O., Pfeiffer, W. C. Souza, C. M. M. & Reuther, R. 1990. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. *Ambio* 19: 11 – 15.
- Manz, W., M. Eisenbrecher, T. R. Neu, and U. Szewzyk. 1998. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology* 25:43-61.
- Marschall, C., Frenzel, P. & Cypionka, H. 1993. Influence of oxygen on sulfite reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, 159: 168 – 173.
- Menking Darrel E., Peter A. Emanuel , James J. Valdes ,Suzanne K. Kracke. 1999.

- Rapid cleanup of bacterial DNA from field samples. *Resources, Conservation and Recycling* 27: 179–186.
- Middelburg J., Klaver J., Nieuwenhuize G., Wielemaker J., Haas A., Vlug W. & van der Nat. 1996. Organic matter mineralization in intertidal sediments along an estuarine gradient. *Marine Ecology Progress Series* 132: 157 – 168.
- Miller TL, Wolin MJ. 1986. Methanogens in human and animal digestive tracts. *Syst. Appl. Microbiol.* 7:223–9.
- Minz, D., Fishbain, S., Green, S., Muyzer, G., Cohen, Y., Rittman, B. & Stahl, D. 1999. Unexpected population distribution in a microbial mat community: Sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to eukaryotic preference for anoxia. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4659 – 4665.
- Miskin P., Rhoades G., Lawlor K., Saunders., Pickup W. 1998. Bacteria in post-glacial freshwater sediments. *Microbiology* 144: 2427 – 2439.
- Moran, M., Torsvik, V., Torsvik, T. & Hodson, R. 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 915-918.
- Munson, M.A., Nedwell, D.B. & Embley, T.M. 1997. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4729–4733.
- Nakagawa T., Hanada S., Maruyama A., Marumo K., Urabe T., y Fukui M. 2002. Distribution and diversity of thermophilic sulfate reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine. *FEMS. Microbiology Ecology.* 41: 199 – 209.
- Namsaraev, B. B., & L. E. Dulov. 1995. Bacterial methane production in the bottom sediments of Lake Baikal. *Mikrobiologiya* 64:346–352.
- Nanninga, H. J., & J. C. Gottschal. 1986. Anaerobic purification of waste water from a potato starch-producing factory. *Water Res.* 20:97–104.
- Nercessian, O., Bienvenu, N., Moreira, D., Prieur, D. & Jeanthon, C. 2005. Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate-reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environmental Microbiology*, 7(1): 118 – 132.
- Nielsen, P. H. 1987. Biofilm dynamics and kinetics during high-rate sulfate reduction under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:27–32. *Lett.* 106:259–264.
- Novitsky, J.A. 1987. Microbial growth rates and biomass production in a marine sediment: Evidence for a very active but mostly nongrowing community. *Appl.*

- Environmental Microbiol. 53: 2368 – 2372.
- Nriagu, J. O., Pfeiffer, W.C. Malm, O., Souza, C. M. M. & Mierle, G, 1992. Mercury pollution in Brazil. *Nature*: 356 – 389.
- Nüsslein, B., Chin, K.J., Eckert, W. & Conrad, R. 2001. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* 3, 460–470.
- Ogram, A., Sun, W., Brockman, F. & Fredrickson, J. 1995. Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2): 763 – 768.
- O’Flaherty v., Lens P., Leaky B. & Colleran E. 1998. Long term competition between sulphate reducing anomethane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Water Research.* 32: 815 – 825.
- Ohkuma, M., S. Noda, K. Horikoshi, & T. Kudo. 1995. Phylogeny of symbiotic methanogens in the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134:45-50.
- Ohkuma M, Noda S, Kudo T. 1999. Phylogeny of symbiotic methanogenes in diverse termites. *FEMS Microbiol Lett* 171:147-153
- Okabe S., Itho T., Satho H., & Watanabe Y. 1999. Analyses of Spatial Distributions of sulfate reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 5107 – 5116.
- Olsen, G., Lane, D., Giovannoni, S. Pace, N. & Stahl, D. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annual. Review Microbiology.* 40: 337 – 365.
- Olson BH y Cooper RC. 1975. Comparison of aerobic and anaerobic methylation of mercuric chloride by San Francisco Bay sediments. *Water Res* 10:113 – 116.
- Oremland, R. S., & B. F. Taylor. 1978. Sulfate reduction and methanogenesis in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42:209-214.
- Oremland, R. & Polcin, S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: Competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6): 1270 – 1276.
- Orphan, V. J., Hinfrichs, K. U., Ussler III, W., Paull, C. K., Taylor, L. T., Sylva, S. P., Hayes, J. M. & Delong, E. F. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1922 – 1934.
- Oude-Elfering S., Visser H., Hulshoff P. & Stams A. 1994. Sulphate reduction in

- methanogenic bioreactors. *FEMS. Microbiology Rev.* 15: 119 – 136.
- Pace, N., Stahl, D., Lane, D. & Olsen, G. 1986. The analysis of microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbiology ecology.* 9: 1 – 55.
- Pak, K. & Bartha, R. 1998. Products of mercury demethylation by sulfidogens and methanogens. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61: 690 – 694.
- Pak, K. & Bartha, R. 1998a. Mercury Methylation and Demethylation in Anoxic Lake Sediments and by Strictly Anaerobic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1013 –1017.
- Pak, K. & Bartha, R. 1998b. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:1987 – 1990.
- Palmer, M., Covich, A., Lake, S., Biro, P., Brooks, J., Cole, J., Dahm, C., Gibert, J., Goedkoop, W., Martens, K., Verhoeven, J. & Van de Bund, W. 2000. Linkages between aquatic sediment biota and life above sediments as potential drivers of biodiversity and ecological processes. *BioScience*, 50(12): 1062 – 1075.
- Pallud, C. & Van Cappellen, P. 2006. Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70: 1148 – 1162.
- Parker RJ, Webster G, Cragg BA, Wightman AJ, Newberry CJ, Ferdelman TG, Kalmeyer J, Jorgensen B., Aiello IW. & Try JC: 2005. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfacers over geological time. *Nature* 436: 390 – 394.
- Parkin, G. F., N. A. Lynch, W.-C. Kuo, L. V. Keuren, & S. K. Bhattacharya. 1990. Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 62:780–788.
- Peroni C., y Rossi G. 1986. Determination of microbial activity in marine sediments by resazurin reduction. *Chemical Ecology.* 2: 205 – 209.
- Petrova, O. Tarasova, B. & Davydova, M. 2002. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose. *Anaerobe*, 1 – 3.
- Pfeiffer. W.C., Lacerda, L.D., Salomonos, W y Malms, O. 1993. Environmental fate of mercury from gold-mining in the Brazilian Amazon. *Environmental*, 1: 26-37.
- Postgate, J. 1984. *The sulphate-reducing bacteria*, 2 ed.
- Pouilly, M., Beck, E., Moraes, M. & Ibañez, C. 2004. *Diversidad biológica en la llanura de inundación del Río Mamoré*. Centro de Ecología Simón I. Patiño – Centro de Difusión, Santa Cruz – Bolivia. 383 pp.

- Purdy, K.J., Nedwell, D.B., Embley, T.M., & Takii, S. 1997. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosms from a Japanese estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 221–234.
- Purdy, K., Nedwell, D., Embley, M. & Takii. 2001. Using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosms from a Japanese estuary. *FEMS. Microbiology Ecology*, 36: 165 – 168.
- Purdy, K.J., Munson, M.A., Nedwell, D.B. & Embley, T.M. 2002. Comparison of the molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of a UK estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 17–21.
- Purdy K., Nedwell, D. & Embley, T. 2003a. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3181 – 3191.
- Purdy, K., Munson, M., Cresswell-Maynard, T., Nedwell, D & Embley, T. 2003b. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in a UK estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 361 – 371.
- Rabus, R., Fukui, m. Wilkes, H. & Widdel, F.. 1996. Degradative Capacities and 16S rRNA- Targeted Whole-Cell Hybridization of Sulfate-Reducing Bacteria in an Anaerobic Enrichment Culture Utilizing Alkylbenzenes from Crude Oil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3605 – 3613.
- Ranjard, L., F. Poly, J. Combrisson, F. Gourbiere, A. Richaume, J. Thioulouse & S. Nazaret. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.* 39:263 – 272.
- Ramsing, F., Kuhl, M. & Jorgensen, B. 1993. Distribution of sulfate-reducing bacteria. O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 3840 – 3849.
- Ramsing, N.B., H. Fossing, T., Gerdelman, G., Andersen, F. & Thamdrup. 1996. Distribution of bacterial populations in a stratified fjord quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Applied Environmental*

- Microbiology, 62: 1391 –1404.
- Raskin L., Rittman, B. & Stahl, D. 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3847 – 3857.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B. & Amann, R. 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3592 – 3602.
- Ravenschlag, K., Sahm, K. & Amann, R. 2001. Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology* 67: 387 – 395.
- Reysenbach, A.-L., Giver, L., Wickham, S. & Pace, R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3417 - 3418.
- Riemann L, Steward GF, Azam F (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environ Microbiol* 66:578–587
- Risatti, J., Capman, W. & Stahl, D. 1994. Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. *Proc. National Academy of Science*, 91: 10173 – 10177.
- Rooney-Varga, J., Devereux, R., Evans, R. & Hines, M. 1997. Seasonal Changes in the Relative Abundance of Uncultivated Sulfate-Reducing Bacteria in a Salt Marsh Sediment and in the Rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3895 – 3901.
- Rothfuss, F., & R. Conrad. 1994. Development of a gas diffusion probe for the determination of methane concentrations and diffusion characteristics in flooded paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14:307–318.
- Roulet, M., Guimarães, J. & Lucotte, M. 2001. Methylmercury Production and Accumulation in Sediments and Soils of an Amazonian Floodplain-Effect of Seasonal Inundation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128: 41 – 60.
- Rudd J & Hamilton R. 1978. Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. *Limnology Oceanography*. 23: 337 – 348.
- Rudd, J.W., Kelly, C.A., St. Louis, V., Hesslein, R.H., Furutani, A., Holoka, M.H., 1986. Microbial consumption of nitric and sulfuric acids in acidified north temperate

- lakes. *Limnol. Oceanogr.* 31, 1267–1280.
- Sahm, K., MacGregor, B., Jorgense, B. & Stahl, D. 1999. Sulphate reduction and vertical distribution of sulfate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environmental Microbiology*, 1(1): 65 – 74.
- Sánchez, S. 2005. Distribución vertical de bacterias sulfato reductoras y de metilmercurio en sedimentos de llanuras de inundación. Tesis para optar al grado de Maestría en Ciencias Biológica y Biomédicas. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – Bolivia. pp.
- Santegoeds, C. M., T. G. Ferdelman, G. Muyzer, & D. de Beer. 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3731–3739.
- Santegoeds, C., Damgaard, L., Hesselink, G., Zopfi, J. Lens, P., Muyzer, G. & d. Beer, D. 1999. Distribution of Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Anaerobic Aggregates Determined by Microsensor and Molecular Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4618 – 4629.
- Sass, H., H. Cypionka, & H.-D. Babenzien. 1997. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:245–255.
- Sass, A., Eschemann, A., Kühl, M., Thar, R., Sass, H. & Cypionka, H. 2002. Growth and chemosensory behavior of sulfate-reducing bacteria in oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 47 – 54.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280.
- Schoenborn., Abdollahi H., Tee W., Dyall Smith M., y Jansen P. 2001. A member of a delta subgroup of proteobacteria from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (2): 787 – 790.
- Schönheit, P., Kristjansson, J.K. and Thauer, R.K. (1982) Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Arch. Microbiol.* 132, 285 – 288.
- Schultz, P. & Urban, N. 2007. Effects of bacterial dynamics on organic matter decomposition and nutrient release from sediments: A modeling study.

- Ecological Modeling, doi:10.1016/j.ecolmodel. 2007.06.026.
- Schramm, A., Santegoeds, C.M., Nielsen, H.K., Ploug, H., Wagner, M., Pribyl, M., Wanner, J., Amann, R. & de Beer, D. (1999) On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4189-4196.
- Schwarz, J., Eckert, W. & Conrad, R. 2007. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *Systematics and Applied Microbiology*, 30: 239 – 254.
- Seifert, R., Nauhaus, K., Blumenberg, M., Krüger, M. & Michaelis, W. 2006. Methane dynamics in a microbial community of the Black Sea traced by stable carbon isotopes in vitro. *Organic Geochemistry*, 37(10): 1411 – 1419.
- Sessitsch A., Gyamfi, S., Stralis-Pavese, N., Weilharter, A. & Pfeifer, U. 2002. RNA Isolation from Soil for Bacterial Community and Functional Analysis: Evaluation of Different Extraction and Soil Conservation Protocols. *Journal of Microbiological Methods*, 51: 171 - 179.
- Sestanovic, S., Solic, M., Krstulovic, N. & Bogner, D. 2005. Volume, abundance and biomass of sediment bacteria in the eastern mid Adriatic Sea. *Acta Adriatica*, 46(2): 177 – 191.
- Silva, G., Oliveira, S., LeGall, J., Xavier, A.V., Teixeira, M., Roudrigues-Pousada, C., 2001. Molecular characterization of *Desulfovibrio gigas* neelaredoxin, a protein involved in oxygen detoxification in anaerobes. *J. Bacteriol.* 183, 4413–4420.
- Simon, M., & F. Azam. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51:201–213.
- Singleton, R., Jr. 1993. The sulfate-reducing bacteria: an overview, p. 1–21. In J. M. Odom and R. Singleton, Jr. (ed.), *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Smith, R. 1993. Determination of mercury in environmental samples by isotope dilution/ICP/MS. *Anal. Chem.* 65: 2485 – 2488.
- Smith R., Doucette-Stamm L., Deloughery C., et al. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriology*. 179: 7135 – 7155.
- Snopek, M.L., Bennett, A., Kraus, J., 1996. Spatial distribution and characterization of sediment in Ashokan Reservoir. *Watershed Restoration Management: Physical*

- Chemical and Biological Considerations, New York City Water Supply Studies. Amer. Water Res. Assoc., New York City, pp. 61–72.
- Sonne-Hansen, J., Westesmann, P. & Ahring, B. 1999. Kinetics of Sulfate and Hydrogen Uptake by the Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria *Thermodesulfobacterium* sp. Strain JSP and *Thermodesulfovibrio* sp. Strain R1Ha3. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1304-1307.
- Sorensen J., Christensen D. & Jorgensen B. 1981. Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Applied Environmental Microbiology*, 42, 5 – 11.
- Southern, E. M. 1993. Methods for imaging radioactive samples in molecular biology. British Electrophoresis Society, Oxford, England.
- Spring S., Schulze R., Overmann J & Schleifer K. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Re.* 24: 573 -590.
- Sprott, G. D. & Beveridge, T. J. 1993. Microscopy. pp. 81 – 127. En Ferry, J., *Methanogenesis*, Chapman & Hall, New York & London.
- Stahl D., Flesher B., Mansfield R. & Montgomery L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 1079 – 1084.
- Steffan, R. J., J. Goksøyr, A. K. Bej, & R. M. Atlas. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2908–2915.
- Steger, J., Vincent, C., Ballard, J. & Krumholz, L.. 2002. *Desulfovibrio* sp. Genes Involved in the Respiration of Sulfate During Metabolism of Hydrogen and Lactate. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1932-1937.
- Stolyar, S., Van Dien, S., Línea, K., Pinel, N., Lie, T., Leigh, J. & Stahl, D. 2007. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Molecular Systems Biology*, 3(92): 1 –14.
- Stumm, W., & J. J. Morgan. 1996. *Aquatic chemistry, chemical equilibria and rates in natural waters*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Suzuki, M. T., & S. J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 625 – 630.
- Sweerts J., Rudd M. , & Kelly A. 1986. Metabolic activities in flocculent surface sediments

- and underlying sandy littoral sediments. *Limnology and Oceanography*. 31: 330 – 338.
- Szewczk R. & Pfenning N. 1990. Competition for ethanol between sulphate reducing and fermenting bacteria. *Archives of Microbiology*, 113, 470-477.
- Takai K & Horikoshi K. 1999. Genetic diversity of Archaea in deep sea hydrothermal vent environments *Genetics*. 152: 1285 – 1297.
- Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C., & Fredrickson, J.K., 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:5750–5760.
- Teske, A., Wawer, C. Muyzer, G. & Ramsing, B. 1996. Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Flord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1405-1415.
- Thamdrup B., Finster K., Hansen J.W. & Bak, F. 1993. Bacterial disproportionation of elemental sulphur coupled to chemical reduction of iron or manganese. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 101 – 108.
- Thebrath, B., F. Rothfuss, M. J. Whiticar, & R. Conrad. 1993. Methane production in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102:279–289.
- Thiele H., Chartrain M & Zeikus J. 1988. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. *Applied Environmental Microbiology* 54: 10 – 19.
- Trimmer, M., Purdy, K. & Nedwell, D. 1997. Process measurement and phylogenetic analysis of the sulfate reducing bacterial communities of two contrasting benthic sites in the upper estuary of the Great Ouse, Norfolk, UK. *FEMS Microbiology Ecology*, 4: 333 – 342.
- Thomsen TR., Finster K. & Ramsing NB. 2001. Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in marine sediment. *Applied Environmental Microbiology* 67: 1646 – 1656.
- Tijssen, P. 1993. Hybridization with nucleic acid probes, part I: theory and nucleic acid precipitation. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Traore, A. S., M.-L. Fardeau, C. E. Hatchikian, J. L. Gall, & J.-P. Belaich. 1983. Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: interspecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 46:1152–1156.
- Torsvik V., Goksoyr J & Daae F. 1990. Applied Environmental Microbiology. 56: 782 – 787.
- Tuschak C., Glaeser J. & Overmann J. 1999. Specific detection of green sulfur bacteria by in situ hybridization with a fluorescently labeled oligonucleotide probe. Arch. Microbiology. 171: 265 – 272.
- Urakawa H., Yoshida T., Nishimura M., Ohwada K. 2000. Characterization of depth related population variation in microbial communities of a coastal marine sediments using 16S rDNA based approaches and quinone profile. Environmental Microbiology 2(5): 542 – 554.
- Van Keulen Geertje, Jeroen Siebring, Krzysztof P. Rembacz, Martin Hoogeveen, Magdalena Tomczynska and Lubbert Dijkhuizen. 2004. Improved method for the isolation of RNA from (standing liquid cultures of) Streptomyces. Journal of Microbiological Methods. 58(1). 139-142
- Vester, F., & Ingvorsen, K. 1998. Improved Most-Probable-Number Method To Detect Sulfate Reducing Bacteria with Natural Media and a Radiotracer. Applied and Environmental Microbiology 64:1700-1707.
- Vetriani, C., H. W. Jannasch, B. MacGregor, D. A. Sathl, & A. L. Reysenbach. 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4375–4384.
- VeWeinbauer, M. 2002. Simultaneous Extraction from Bacterioplankton of Total RNA and DNA Suitable for Quantitative Structure and Function Analyses. Applied and Environmental Microbiology 68:1082-1087.
- Visser A., Nozhevnikova A. & Lettinga G. 1993. Sulphide inhibition of methanogenic activity at various pH levels at 55°C. J. Chem. Technol. Biotechnol. 57: 9 – 14.
- Visser, A. 1995. the anaerobic treatment of sulphate-containing wastewater. Ph.D. Tesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
- Voordouw, G. 1995. The Genus Desulfovibrio: The Centennial. Applied and Environmental Microbiology, 61(8): 2813 – 2819.
- Ward, D. M., & M. R. Winfrey. 1985. Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments, p. 219–286. In H. W. Jannasch and P. J. L. Williams (ed.), Advances in microbial ecology. Plenum Press, New York.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Hamamura, N., & Kaku, N. 2002. Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the

- bottom of an underground crude oil storage cavity. *Appl Environ Microbiol* 68: 3899–3907.
- Weinbauer, M. G. 2002. Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1082 – 1087.
- Wheeler, W. & Stahl, D. 2000a. Critical factors influencing the recovery and integrity of rRNA extracted from environmental samples: use of an optimized protocol to measure depth- related biomass distribution in freshwater sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 153 – 162.
- Wheeler, E., Zheng, D. & Raski, L. 2000b. The presence of humic substances and DNA in RNA Extracts Affects Hybridization Results. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4547 - 4554.
- Widdel, F. 1988. Microbiology and ecology of sulfate - and sulfur-reducing bacteria. En: Zehnder, A., *Ecology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, New York.
- Widdel, F., & F. Bak. 1991. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York.
- Widdel, F., & Bak, F. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. pp. 3352 – 3378. En: Balows, A., Dworkin, H., Harder, M., & Schleifer, K.-H., *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- Williams D. 1987. *The ecology of Temporary waters*. London: Croom Helm.
- Wilms R., Sass H., Köster J., Cypionka H. & Engelen B. 2006. Specific bacterial, archeal and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Applied Environmental Microbiology* 72: 2756 – 2764.
- Wilms, R., Sass, H., Köpke, B., Cypionka, H. & Engelen, B. 2007. Methane and sulphate profiles within the subsurface of a tidal flat are reflected by distribution of sulphate- reducing bacteria and methanogenic archaea. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 611 – 621.
- Winfrey, M. & Ward. 1983. Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 33: 275 – 281.
- Winfrey, M.R. & Zeikus, J.G. (1977) Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 275.
- Wobus, C. Bleul, S. Maassen, C. Scheerer, M. Schuppler, E. Jacobs, I. Roske. 2003. Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of

- different trophic state, *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 331–347.
- Woese, C.R., Magrum, L.J. and Fox, G.E. 1978. Archaeobacteria, *J Mol Evol* 11, 245-51
- Woese, C., Kandler, O. & Wheelis, M. 1990. Towards a natural system of organism: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Evolution*, 87: 4576 – 4579.
- Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F., Boffelli, D., Anderson, I., Barry, K., Shapiro, H., Szeto, E., Kyrpides, N., Mussman, M., Amann, R., Bergin, C., Ruehland, C., Rubin, E. & Dubiller, N. 2006. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature*, 443: 950 – 955.
- Wright ADG, Williams AJ, Winder B, Christophersen C, Rodgers S, Smith K. 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Appl Environ Microbiol.* 70:1263–70.
- Wu, W.M., Mahendra, K.J., Conway de Macario, E., Thiele, J.H., & Zeikus, J.G. 1992. Microbiol composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 282–290.
- Yoda, M., Kitagawa, M. & Miyayii, Y. 1987. Long term competition between sulfate reducing and methane producing bacteria in anaerobic biofilm. *Water Research*, 21: 1547–1556.
- Zhang y Fang. 2001. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilms. *Applied Microbiology Biotechnology.* 57: 437 – 440.
- Zepp-Falz K., Holliger C., Grosskopf R., Liesack A., Nozhevnikova A., Muller B., Wehrli B & Hahn D. 1999. Vertical distribution of methanogenes in the anoxic sediments of Rotsee. *Applied Environmental Microbiology.* 65: 2402 – 2408.
- Zinder, S. H. 1993. Physiological ecology of methanogens. pp. 128 – 206. En: J. G. Ferry, *Methanogenesis*, Chapman & Hall, New York & London.
- Zinkevich, V., & IBeech, I. 2000. Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiology Ecology*, 34:147-155.
- Zwart, Byron C. Crump, Miranda P. Kamst-van Agterveld, Ferry Hagen, Suk-Kyun Han. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY.* 28: 141–155.

## ANEXOS

Anexo **1111**, Valores promedio de factores fisicoquímicos y geoquímicos e índice de correlación entre los sitios CEN y DEM en las lagunas en estudio

Eliminado: 1

Parámetro	La Granja	Río Viejo	Chitiwara	San Gregorio
<b>% de agua</b>				
CEN	49,81	61,69	56,62	93,92
DEM	55,72	68,43	50,20	40,74
Correlación	0,64	0,90	0,66	0,78
<b>Densidad</b>				
CEN	0,74	0,51	0,59	0,06
DEM	0,53	0,39	0,74	0,96
Correlación	0,52	0,86	0,59	0,83
<b>pH</b>				
CEN	7,30	6,81	6,66	6,80
DEM	6,74	6,48	6,47	5,90
Correlación	0,28	0,18	0,22	-0,33
<b>Eh</b>				
CEN	144,1	-105,7	-142,2	-92,7
DEM	-129,3	-112,7	-72,9	68,2
Correlación	0,0	1,0	0,3	0,8
<b>% de carbono</b>				
CEN	0,39	1,75	2,91	17,25
DEM	1,88	3,77	2,85	1,22
Correlación	0,49	0,84	0,53	0,23
<b>% de nitrógeno</b>				
CEN	0,07	0,19	0,23	2,07
DEM	0,17	0,33	0,30	0,11
Correlación	0,52	0,91	0,54	0,11
<b>Razón C/N</b>				
CEN	5,22	7,66	11,80	8,86
DEM	9,31	11,25	9,46	11,60
Correlación	0,47	0,06	-0,75	-0,32

**Anexo 2222**, Índice de correlación del %C y %N entre lagunas de aguas blancas y negras.

Eliminado: 2

	La Granja		Rio Viejo		Media
<b>Chitiwara</b>	<b>CEN</b>	<b>DEM</b>	<b>CEN</b>	<b>DEM</b>	
% C	0,24	-0,01	0,27	0,83	0,33
% N	0,23	-0,27	0,18	0,80	0,24
	La Granja		Rio Viejo		Media
<b>San Gregorio</b>	<b>CEN</b>	<b>DEM</b>	<b>CEN</b>	<b>DEM</b>	
% C	0,53	-0,01	0,56	0,24	0,33
% N	0,59	0,07	0,59	0,13	0,34
<b>MEDIA</b>				<b>%C</b>	0,33
				<b>%N</b>	0,29

**Anexo 3333**, Abundancia relativa total de SRB y MA

Eliminado: 3

	Total SRB	Total MA
<b>La Granja (CEN)</b>	38,79	25,63
<b>La Granja (DEM)</b>	47,42	29,02
<b>Río Viejo (CEN)</b>	40,07	21,56
<b>Río Viejo (DEM)</b>	39,57	14,59
<b>Chitiwara (CEN)</b>	36,95	22,58
<b>Chitiwara (DEM)</b>	62,42	30,42
<b>San Gregorio (CEN)</b>	56,15	20,75
<b>San Gregorio (DEM)</b>	87,60	33,88

**Anexo 4444.** Índice de correlación de la abundancia de SRB y MA  
entre las lagunas estudiadas

Eliminado: 4

SRB	Chitiwara (CEN)	San Gregorio (CEN)	SRB	Chitiwara (DEM)	San Gregorio (DEM)
La Granja (CEN)	0,50	0,49	La Granja (DEM)	0,47	0,11
Río Viejo (CEN)	-0,65	-0,49	Río Viejo (DEM)	0,04	-0,68
MA	Chitiwara (CEN)	San Gregorio (CEN)	MA	Chitiwara (DEM)	San Gregorio (DEM)
La Granja (CEN)	-0,26	0,39	La Granja (DEM)	0,20	-0,35
Río Viejo (CEN)	-0,18	-0,50	Río Viejo (DEM)	-0,23	-0,57

**Anexo 5555.** Índice de correlación entre sitios de muestreo en relación  
al porcentaje total de SRB y MA

Eliminado: 5

	Total SRB	Total MA
La Granja (CEN y DEM)	-0,57	0,24
Río Viejo (CEN y DEM)	0,09	0,18
Chitiwara (CEN y DEM)	-0,85	-0,34
San Gregorio (CEN y DEM)	0,07	0,42

Anexo 6666. Índice de correlación entre los grupos de SRB y MA y los factores fisicoquímicos y geoquímicos en las lagunas

Eliminado: 6

La Granja (CEN)						Rio Viejo (CEN)					
	%C	%N	Ph	Eh	% Agua		%C	%N	Ph	Eh	% Agua
DFM	0,41	0,69	-0,39	-0,69	0,76	DFM	0,33	0,31	0,10	0,34	0,35
DBB	0,80	0,83	-0,09	-0,90	0,83	DBB	0,20	0,19	0,44	0,28	0,27
DSB	0,76	0,87	-0,38	-0,75	0,85	DSB	0,17	0,15	0,27	-0,07	0,01
DCC	0,11	0,43	-0,40	-0,56	0,39	DCC	0,60	0,60	0,50	0,70	0,68
DSV	-0,05	0,17	-0,30	0,11	0,07	DSV	0,34	0,33	0,49	0,49	0,41
MC	0,21	0,40	-0,49	0,04	0,30	MC	0,09	0,11	0,08	0,39	0,25
MG	0,08	0,17	-0,02	0,12	0,08	MG	0,15	0,18	0,00	0,43	0,32
MSMX	0,81	0,72	0,08	-0,51	0,66	MSMX	-0,20	-0,23	0,23	-0,28	-0,27
La Granja (DEM)						Rio Viejo (DEM)					
	%C	%N	Ph	Eh	% Agua		%C	%N	Ph	Eh	% Agua
DFM	0,12	0,25	-0,46	0,55	0,32	DFM	0,62	0,71	0,32	0,76	0,65
DBB	-0,62	-0,52	0,08	0,28	-0,45	DBB	0,14	0,14	0,37	0,08	0,07
DSB	-0,26	-0,04	-0,24	-0,16	-0,22	DSB	0,28	0,48	-0,10	0,66	0,43
DCC	0,07	0,15	-0,34	0,21	0,10	DCC	0,58	0,49	0,56	0,42	0,48
DSV	-0,12	-0,05	-0,30	0,60	0,15	DSV	0,20	0,17	0,32	0,13	0,17
MC	0,05	0,11	-0,54	0,51	0,31	MC	-0,29	-0,34	0,31	-0,33	-0,39
MG	-0,03	0,12	-0,25	0,35	0,12	MG	0,31	0,19	0,42	0,12	0,20
MSMX	-0,63	-0,54	0,06	0,08	-0,41	MSMX	-0,36	-0,26	0,13	-0,17	-0,36
Chitiwara (CEN)						San Gregorio (CEN)					
	%C	%N	Ph	Eh	% Agua		%C	%N	Ph	Eh	% Agua
DFM	-0,44	-0,39	-0,08	0,42	-0,34	DFM	0,49	0,47	0,58	-0,26	0,53
DBB	0,91	0,83	-0,12	0,11	0,95	DBB	0,81	0,84	0,17	-0,56	0,06
DSB	0,00	0,09	-0,42	0,48	0,12	DSB	0,43	0,39	0,34	-0,51	0,28
DCC	-0,54	-0,53	-0,11	0,08	-0,67	DCC	0,84	0,83	0,14	0,21	0,65
DSV	0,82	0,77	0,44	-0,26	0,75	DSV	0,64	0,61	0,22	-0,12	0,60
MC	-0,33	-0,23	-0,27	0,35	-0,37	MC	0,27	0,26	0,07	-0,25	0,33
MG	0,59	0,52	0,50	-0,28	0,53	MG	0,59	0,60	0,47	0,18	0,60
MSMX	0,13	0,28	0,58	-0,53	-0,08	MSMX	-0,51	-0,55	-0,05	-0,91	-0,64
Chitiwra (DEM)						San Gregorio (DEM)					
	%C	%N	Ph	Eh	% Agua		%C	%N	Ph	Eh	% Agua
DFM	-0,18	-0,25	-0,23	0,19	-0,63	DFM	0,55	0,37	-0,74	0,63	0,54
DBB	-0,73	-0,77	0,15	-0,16	0,51	DBB	-0,65	0,42	0,64	-0,32	-0,22
DSB	-0,51	-0,59	-0,46	0,45	-0,79	DSB	0,38	0,41	-0,37	0,16	0,06
DCC	-0,37	-0,43	-0,28	0,13	-0,66	DCC	0,12	0,04	-0,86	0,53	0,40
DSV	-0,66	-0,74	-0,53	0,63	-0,51	DSV	-0,19	-0,21	0,24	-0,78	-0,85
MC	-0,41	-0,51	-0,57	0,46	-0,74	MC	0,27	0,33	-0,16	-0,21	-0,31
MG	0,58	0,59	0,38	-0,78	0,72	MG	0,25	0,06	-0,60	0,85	0,84
MSMX	-0,20	-0,19	-0,13	-0,08	-0,46	MSMX	0,32	0,21	-0,27	0,39	0,41

Anexo ~~7777~~, Dominancia de los grupos de SRB y MA en relación a la señal de UNI ajustada

Eliminado: 7

DOMINANCIA ENTRE GRUPOS SRB Y MA ACETOGENICAS			
LAGUNAS AGUAS BLANCAS			
DSB/MSMX			0,82
DCC/MSMX			0,63
Media			<b>0,73</b>
DOMINANCIA ENTRE GRUPOS SRB Y MA HIDROGENOTROFAS			
LAGUNAS AGUAS NEGRAS			
DFM/MC	0,9	DFM/MG	1,1
DBB/MC	1,4	DBB/MG	1,8
DSV/MC	0,7	DSV/MG	0,9
Media	<b>1</b>		<b>1,27</b>