

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ACTIVIDAD BACTERIANA  
SULFATORREDUCTORA Y METANOGENICA EN LOS SEDIMENTOS DE DOS  
ECOSISTEMAS ESTUARINO-LAGUNARES DEL ESTADO DE CHIAPAS**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas**

**PRESENTA**

**María del Rocío Torres Alvarado**

**Fecha (julio/2009)**

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma  
Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del  
CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio  
PFP-20-93**

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco  
aprobó la tesis que presentó

**María del Rocío Torres Alvarado**

El día 29 de julio del año de 2009

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Florina Ramírez Vives

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa

Sinodal: Dra. Nathalie Cabirol

Sinodal: Dr. Frederick Thalaso Siret

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

El alcanzar una meta es una gran satisfacción personal, pues es la culminación de todos nuestros esfuerzos; no obstante, esa satisfacción se vuelve nada si no reconocemos a todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron a nuestra realización.

A mi hija Victoria Isabel, tu amor, apoyo y paciencia han sido muy importantes en mi vida. Por este Doctorado te quiero agradecer principalmente por aquellas horas que estuviste conmigo en la Universidad mientras realizaba el trabajo experimental, así como los tiempos de convivencia que sacrificaste para que pudiera terminar.

A mis padres Carmelita y Belisario, por su preocupación y apoyo, sobre todo en aquellos momentos en que las cosas no salían como esperaba.

A mis hermanos Antonia, Oscar, Carmen (la Nena), Belisario y Carlos; así como a mi cuñado Raúl, por sus palabras de aliento cuando dudaba si valía la pena continuar.

A Francisco Gutiérrez por su amor y amistad a lo largo de estos años.

A mi amiga Laura "Oropel", a quien le toco vivir conmigo todos los problemas personales y académicos por los que pase durante la realización de mi Doctorado y quien me dio la mano cuando más lo necesitaba para no perderme en el camino.

A mi Comité Tutorial, Florina, Paco e Irene, por su guía y paciencia, pero sobre todo por su confianza y amistad. Espero que consideren que valió la pena, a pesar de todos los atrasos.

A mis alumnas Diana, Montserrat, Jacqueline, Mireya, Teresa y Julia, cuyo servicio social apoyó parte del trabajo experimental.

A mis alumnos de Licenciatura y Posgrado: Lucy, Carlos, Aníbal, Omar, Paola, Juan Carlos (pequeño), Ángeles y Gaby quienes en ocasiones tuvieron que esperar algunas semanas para que pudiera revisar los avances de sus trabajos.

A Claudia, Jenny, Jaime, Amelia y Alejandra, quienes pacientemente me explicaron y guiaron en el manejo de los equipos, así como al proporcionarme información adicional sobre los métodos.

A mis amigos del Laboratorio de Ecosistemas Costeros: Francisco Contreras (q.e.p.d.), Francisco Gutiérrez, Laura Calva y Ofelia Castañeda, quienes confiaron en mi trabajo y me apoyaron con parte de su presupuesto. Espero que después no me quieran cobrar y con intereses.

A las personas que me pusieron obstáculos para la realización del Doctorado, porque al cerrarme unas puertas me llevaron a buscar otras, que al abrirlas fueron más beneficiosas: “los obstáculos fueron más estímulo que adversidad”.

Finalmente quiero agradecer a dos personas muy especiales para mí y que desafortunadamente no pudieron ver la conclusión de este trabajo, Jorge de la Rosa y Francisco Contreras, gracias por sus enseñanzas y amistad a toda prueba, los extraño mucho.

La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento.

Es un viaje, nunca una llegada.

*Karl Raimund Popper*

Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.

*Isaac Newton*

## RESUMEN

Las bacterias sulfatorreductoras y las arqueas metanogénicas participan en las fases terminales de la mineralización anaerobia de la materia orgánica en los sedimentos costeros; sin embargo, existen pocos estudios que evalúan su distribución, abundancia y actividad en las lagunas costeras tropicales. En el presente trabajo se investigó la dinámica temporal y espacial de las poblaciones bacterianas sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas en el sedimento de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, complejos de lagunas costeras localizados en la región sureste del estado de Chiapas, México. Las muestras de sedimento se colectaron en las temporadas de secas (junio 2002, febrero y mayo 2003) y lluvias (octubre y noviembre 2002, julio 2003). El método del Número Más Probable se empleó para la cuantificación de la microbiota a partir de diferentes sustratos. Se evaluó también la actividad cinética a partir de acetato, tanto en presencia como en ausencia de sulfatos en el medio. Las bacterias sulfatorreductoras y las arqueas metanogénicas fueron abundantes en el sedimento de las lagunas estudiadas, cuantificándose abundancias de  $10^5$ - $10^9$  células/g sedimento de bacterias sulfatorreductoras y  $10^5$ - $10^8$  células/g sedimento de metanogénicas, intervalos superiores a los determinados en sedimentos de zonas templadas. Las bacterias sulfatorreductoras fueron el grupo dominante durante la temporada de secas, siendo su abundancia por sustrato: lactato ( $1.09 \times 10^{10}$  células/g sedimento) > propionato ( $1.84 \times 10^9$  células/g sedimento) > acetato ( $1.52 \times 10^9$  células/g sedimento) > hidrógeno ( $1.81 \times 10^8$  células/g sedimento). La densidad de las arqueas metanogénicas se incrementó en los

meses asociados a las lluvias, siendo el orden por sustrato: metanol ( $1.39 \times 10^8$  células/g sedimento) > hidrógeno ( $3.11 \times 10^7$  células/g sedimento) > acetato ( $2.38 \times 10^7$  células /g sedimento). La cinética a partir de acetato fue superior en los medios con sulfatos, dominando entonces la sulfatorreducción sobre la metanogénesis en los sedimentos estudiados. La abundancia y la actividad de la microbiota se relacionaron con las variables fisicoquímicas en el sedimento y agua intersticial: temperatura, pH, Eh, salinidad, sulfatos, carbono orgánico y carbohidratos. Se propone un modelo conceptual para explicar como la dinámica de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica regula la descomposición de la materia orgánica en sedimentos lagunares de latitudes tropicales que están influidos por cambios estacionales en la descarga de los ríos.

## ABSTRACT

Sulfate reducing and methanogenic archaea play an important role in the terminal phases of anaerobic mineralization of organic matter in coastal sediments, yet there are few studies evaluating their distribution, abundance and activity in tropical coastal lagoons. In this work the temporal and spatial dynamic of methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria was studied in the sediments of Chantuto-Panzacola and Carretas-Pereyra, a coastal lagoon complex located in southeastern region of Chiapas State, Mexico. Sediment samples were collected in the dry (June 2002, February, and May 2003) and rainy (October, and November 2002, July 2003) seasons. The Most Probable Number Method was used for selective enumeration of sulfate-reducing bacteria, and methanogenic archaea with different substrates. Acetate competition was evaluated, with and without sulfates in the medium. The sulfate reducing bacteria and methanogenic archaea were abundant in the sediment of studied lagoons, with densities of  $10^5$ - $10^9$  cells/g sediment of sulfate reducing bacteria, and  $10^5$ - $10^8$  cells/g of methanogenic archaea, higher ranges than those reported in sediments in temperate aquatic ecosystems. The sulfate reducing bacteria were the dominant group in dry season. The abundance by substrate of this group was: lactate ( $1.09 \times 10^{10}$  cells/g sediment) > propionate ( $1.84 \times 10^9$  cells/g sediment) > acetate ( $1.52 \times 10^9$  cells/g sediment) > hydrogen ( $1.81 \times 10^8$  cells/g sediment). Methanogenic archaea abundance was higher in months associated to the rainy season with the order by substrate: methanol ( $1.39 \times 10^8$  cells/g sediment) > hydrogen ( $3.11 \times 10^7$  cells/g sediment) > acetate ( $2.38 \times 10^7$  cells/g sediment). The kinetic activity with acetate was higher with sulfates in the medium, then the sulfate reduction was the most important

process in the studied sediments. The abundance and activity of microbiota, which was correlated with modifications in pore water and sediment physicochemical properties: temperature, pH, Eh, salinity, sulfates, organic carbon and carbohydrates. It propose a conceptual model to explain how the dynamic of sulfate reducing bacteria and methanogenic archaea regulating anaerobic organic matter decomposition in lagoon sediments in tropical latitudes are influenced by seasonal changes in river discharge.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco Teórico</b>	
2.1 Ecosistemas costeros	5
2.2 Cadena del detritus	10
2.3 Materia orgánica	11
2.4 Mineralización de la materia orgánica	15
2.5 Bacterias sulfatorreductoras	26
2.6 Arqueas metanogénicas	34
2.7 Interacciones entre la microbiota	43
2.8 Organismos detritófagos	46
2.9 Métodos de estudio de la microbiota	48
<b>3. Antecedentes</b>	61
<b>4. Justificación</b>	64
<b>5. Objetivos</b>	
5.1 Objetivo general	68
5.2 Objetivos particulares	68
<b>6. Hipótesis</b>	
6.1 Hipótesis general	70
6.2 Hipótesis particulares	70
<b>7. Área de estudio</b>	72

<b>8. Material y Métodos</b>	
8.1 Procedimiento de campo.	81
8.2 Procedimiento de laboratorio.	82
8.3 Análisis estadístico de los resultados.	91
<b>9. Resultados</b>	
9.1 Características generales de las lagunas	92
9.2 Caracterización fisicoquímica	93
9.3 Caracterización microbiológica	105
Bacterias sulfatorreductoras	105
Arqueas metanogénicas	110
Actividad cinética	112
Análisis moleculares	117
9.4 Análisis estadístico.	127
<b>10. Discusión</b>	
10.1 Variables fisicoquímicas	129
10.2 Caracterización microbiológica	144
Abundancia	144
Distribución temporal	150
Distribución espacial	166
Actividad cinética	177
Análisis moleculares	185
10.3 Mineralización anaerobia en lagunas costeras. Un modelo conceptual.	190
<b>11. Conclusiones</b>	197
<b>12. Perspectivas futuras</b>	200
<b>13. Anexo metodológico</b>	202

## **14. Referencias**

223

## **15. Apéndices**

### 15. 1 Productos de trabajo

## 1. INTRODUCCIÓN

Los estuarios y lagunas costeras presentan una elevada productividad y constituyen reservorios importantes de materia orgánica (Day *et al.*, 1987; Thode Andersen & Jørgensen., 1989). La materia orgánica en estos ambientes es mineralizada principalmente en el sedimento a través de procesos anaeróbicos, siendo la sulfatorreducción el proceso metabólico dominante (Jørgensen, 1982; Senior *et al.*, 1982; Fukui *et al.*, 1997); aunque, también se ha detectado y cuantificado la producción de metano y la presencia de arqueas metanogénicas en números relativamente altos (Hines & Buck, 1982; Oremland *et al.*, 1982). Los patrones de distribución de las arqueas, el número de éstas, así como los parámetros físicos, químicos y nutricionales que gobiernan su abundancia y distribución han sido evaluados principalmente en sedimentos lacustres y de humedales dulceacuícolas (Zeep Falz *et al.*, 1999; Kotsyurbenko *et al.*, 2004).

La mayor parte de los estudios acerca de la abundancia y actividad de las bacterias sulfatorreductoras (BSR) y de las arqueas metanogénicas (AM) en estuarios se han llevado a cabo principalmente en latitudes templadas, donde la temperatura es uno de los principales factores que influye en la función de los ecosistemas. Estos trabajos se han centrado en evaluar las poblaciones microbianas de la zona intermareal de marismas costeros con *Spartina alterniflora* (Jones & Paynter, 1980; Franklin *et al.*, 1988) y, en menor proporción, en sedimentos de lagunas costeras con presencia de pastos marinos (*Ruppia* sp y *Zoostera noltii*) y manglares (Mohanraju & Natarajan, 1992; Schaub & Gemerden, 1996; Mohanraju *et al.*, 1997). En estas

investigaciones se ha cuantificado sólo alguna de las comunidades microbianas, ya sea sulfatorreductoras o metanogénicas, con dos o tres sustratos y muy pocos estudios han incluido ambas comunidades (Oremland & Polcin, 1982; Winfrey & Ward, 1983). Como resultado de lo anterior, se ha demostrado que el acetato, propionato e hidrógeno son los principales sustratos para la sulfatorreducción (Sørensen *et al.*, 1981; Banat & Nedwell, 1983), mientras que el acetato e hidrógeno son importantes para la metanogénesis (Balba & Nedwell, 1982; King, 1984). Lo anterior da como resultado que se pueda presentar una competencia entre las BSR y las AM por el hidrógeno y el acetato disponibles, favoreciéndose la sulfatorreducción en ecosistemas donde la concentración de sulfatos es elevada (Abram & Nedwell, 1978).

Se ha establecido que en los estuarios existe un gradiente de salinidad desde la porción dulceacuícola hacia la zona marina en la boca del río. Como consecuencia de este gradiente, existe una separación espacial de los procesos anaerobios terminales implicados en la degradación de la materia orgánica: en la zona marina con altos contenidos de sulfatos domina la sulfatorreducción, mientras que en la porción dulceacuícola (con bajos contenidos de sulfatos) prevalece la metanogénesis, por lo que el factor clave que controla la dominancia de los procesos de mineralización es la disponibilidad de sulfatos (Takii & Fukui, 1991; Purdy *et al.*, 2001). Purdy *et al.* (2002) reportaron que la metanogénesis es el proceso más importante en la porción dulceacuícola del estuario Colne (Reino Unido), mientras que la sulfatorreducción es la vía principal en la porción salobre y marina. En otros

trabajos se menciona que la disponibilidad y calidad de los sustratos también influyen en la distribución de las comunidades sulfatorreductoras y metanogénicas (Schaub & Gemerden, 1996).

Las lagunas costeras, en contraste con los estuarios, tienen una comunicación restringida con el mar; aunado a lo anterior, en las latitudes tropicales se presentan fluctuaciones significativas en la descarga de los ríos y en los gradientes hidrológicos asociados como resultado de los patrones de precipitación fuertemente estacionales, que afectan los procesos biogeoquímicos en los sedimentos bentónicos e intermareales (por ejemplo, la degradación de la materia orgánica). Existen pocos trabajos que evalúen la dinámica de las BSR y AM en sedimentos de lagunas tropicales, a partir de éstos se ha determinado que en los sedimentos de lagunas costeras asociadas a manglares, las AM que utilizan metanol y metilaminas son el principal componente microbiano (Ramamurthy *et al.*, 1990; Mohanraju & Natarajan, 1992; Mohanraju *et al.*, 1997).

Debido a que existe poca información disponible donde se analice simultáneamente la dinámica de las BSR y de las AM en ecosistemas costeros tropicales sujetos a una variabilidad alta en la descarga de los ríos y del régimen de salinidad, el objetivo del presente trabajo fue investigar la variación temporal y espacial de las comunidades sulfatorreductoras y metanogénicas en los sedimentos bentónicos de dos sistemas costeros tropicales localizados en el Pacífico Mexicano, en las épocas climáticas de secas y lluvias para: 1) cuantificar la densidad de las BSR y de las AM con diferentes

donadores de electrones (lactato, acetato, hidrógeno, propionato y metanol) y compararla con las reportadas para otros ambientes de zonas templadas, 2) evaluar la competencia por acetato entre las BSR y AM, 3) analizar los cambios en la composición de las comunidades de BSR y AM, 4) relacionar los cambios en dinámica de las BSR y AM como respuesta a las condiciones climáticas de la región, y 5) proponer un modelo conceptual de la dinámica y distribución de dichas comunidades microbianas en los sedimentos bentónicos de lagunas costeras tropicales.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 ECOSISTEMAS COSTEROS.**

Las zonas costeras se caracterizan por la presencia de diversos ecosistemas como sistemas estuarinos (fiordos, estuarios y lagunas costeras), arrecifes de coral y humedales. Los sistemas estuarinos son los ambientes más complejos, Day (1980) los definió como cuerpos acuáticos costeros parcialmente cerrados, temporal o permanentemente abiertos al mar y en los cuales hay una variación de la salinidad por la mezcla de agua marina con la dulceacuícola derivada del drenaje terrestre.

#### **A. Fiordos.**

Ecosistemas acuáticos localizados en las costas de latitudes altas erosionadas por los glaciares, son comunes en zonas de subducción, por lo que llegan a tener hasta más de 800 m de profundidad. Son de fondos rocosos y generalmente presentan una columna de agua estancada con un hipolimnio anóxico.

#### **B. Estuarios.**

Son cuerpos costeros con un eje principal perpendicular a la línea de costa. Morfológicamente tienen forma de embudo, donde el agua tienen una conexión abierta con el mar debido al flujo del río que desemboca en el océano hasta el límite efectivo de la influencia mareal, por lo que el agua marina se encuentra diluida y se forma un gradiente de salinidad longitudinal (Perillo, 1995). Pritchard (1967) clasificó los estuarios en cuatro categorías, con base en sus características de circulación y

salinidad:

- Tipo A, altamente estratificado. El flujo del río controla completamente la circulación del estuario y los efectos mareales son de menor importancia. Debido a que el aporte dulceacuícola que llega al estuario es de menor densidad en comparación con la entrada de agua marina, se desplaza en la superficie. Como resultado, en estos estuarios se presentan dos estratos en la columna de agua, uno superior de menor densidad y uno inferior de mayor densidad, separados entre sí por una haloclina.
- Tipo B, parcialmente mezclado y moderadamente estratificado. La influencia mareal aumenta y la fuerza del aporte fluvial disminuye, originándose una mezcla turbulenta en el estuario. Como resultado de lo anterior la haloclina es reemplazada por una columna de agua que tiene un aumento gradual de la salinidad desde la superficie hacia el fondo.
- Tipo C, verticalmente homogéneo. La influencia mareal es mayor con respecto a la descarga del río, por lo que la columna de agua se encuentra bien mezclada y el gradiente vertical de salinidad desaparece. Llega a mantenerse un gradiente de salinidad horizontal debido al efecto de la fuerza de Coriolis.
- Tipo D, seccionalmente homogéneo. La fuerza mareal es muy elevada con respecto al aporte fluvial y la profundidad del estuario es pequeña, por lo cual

se crea una mezcla vertical que rompe el gradiente vertical y lateral de la salinidad. Sólo se mantiene el gradiente longitudinal.

Por las características anteriores, la mayoría de los estuarios presentan zonas de turbidez máxima que provocan una baja penetración de la luz en estos ambientes, lo que generalmente origina características heterotróficas; por lo cual los estuarios son una fuente importante de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) hacia la atmósfera (Gattuso *et al.*, 1998; Frankignoulle & Middelburg, 2002). Sin embargo, bajo determinadas condiciones locales y temporales se ha observado la presencia de características autotróficas como resultado de la actividad fitoplanctónica. Los estuarios se encuentran ampliamente distribuidos en las costas de Estados Unidos, Canadá, Europa, Centro y Sudamérica, Asia y África.

### **C. Lagunas costeras.**

Las lagunas costeras se definen como cuerpos de agua someros (generalmente menos de 5 m de profundidad) caracterizados por la presencia de una barrera arenosa conocida como cordón litoral, que separa la laguna del mar abierto y donde la conexión marina se mantiene a través de la boca o canales mareales (De Wit *et al.*, 2001). El eje principal de la laguna es paralelo a la costa y el área superficial de la masa de agua es mayor en relación al tamaño de la boca. La mayoría de las lagunas están relacionadas con una cuenca continental dulceacuícola a través de los aportes fluviales, algunos permanentes y otros temporales. Estos aportes pueden ser

muy fluctuantes, con volúmenes mínimos durante la temporada de secas y máximos en la temporada de lluvias debido al incremento de la precipitación.

Las características anteriores determinan que los gradientes de salinidad a menudo sean complejos. Las lagunas costeras generalmente presentan una salinidad más o menos homogénea en la parte central, mientras que en las regiones sujetas a la influencia marina y fluvial, los gradientes son más pronunciados. Como resultado de lo anterior se crean diferentes zonas hidrológicas con diferentes tiempos de residencia. La mayor parte de las lagunas están sujetas a la influencia de las mareas. Con base en la amplitud mareal las lagunas costeras se pueden clasificar en micromareales (0-2 m de amplitud), mesomareales (2-4 m de amplitud), macromareales (4-6 m de amplitud) y megamareales (6-12 m de amplitud) (De Wit, 2003). Las lagunas costeras son más comunes en zonas micromareales donde la planicie costera fue inundada durante la elevación del nivel del mar en el Holoceno y ocupan aproximadamente el 13% de las costas mundiales (Nichols & Biggs, 1985).

La diversidad biológica en los ambientes estuarinos de regiones templadas es menor, en comparación con los de latitudes bajas, y las actividades de las poblaciones están estacionalmente programadas por factores ambientales (principalmente la temperatura y el fotoperíodo) a lo largo de un ciclo anual. Por el contrario, en las zonas tropicales debido a que hay menos factores de estrés sobre las poblaciones, la diversidad biológica es mayor. La mayoría de los estuarios y lagunas costeras son ecosistemas con una productividad elevada debido al aporte

considerable de nutrientes provenientes de varias fuentes que resulta en la presencia de diversos productores primarios como fitoplancton, marismas y pastos marinos (Sánchez, 1993; Santoyo, 1993).

La vegetación característica de los estuarios y lagunas costeras de regiones templadas son las marismas. Las marismas son plantas herbáceas representadas por las especies de los géneros *Spartina*, *Salicornia*, *Juncus*, *Limonium* y *Plantago*, las cuales se distribuyen en la zona supramareal. Aunado a lo anterior, en algunos estuarios se presentan playas limosas intermareales con biopelículas de diatomeas.

Los manglares sustituyen a las marismas en zonas subtropicales y tropicales, en éstos se incluyen las especies *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Avicenia germinans* (mangle negro), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco) y *Conocarpus erectus* (botoncillo), como las más representativas en México. Las marismas y manglares son ecológicamente importantes por su alta productividad y por ser una fuente importante de materia orgánica para las zonas costeras. Asimismo su sistema de raíces actúa como una trampa de sedimentos, contribuyendo a estabilizar la línea de costa y representan un hábitat para numerosos invertebrados, peces y aves.

Los sistemas estuarino-lagunares desempeñan una función ecológica importante como zonas de crianza de diversas especies de peces y mariscos, muchos de los cuales son recursos pesqueros importantes. Asimismo, las lagunas costeras han sido

explotadas para la producción de sal, actividades de transporte, turísticas y de acuicultura.

Los estuarios son característicos en las costas del Atlántico de Norteamérica, mientras que las lagunas son dominantes en las costas de suroeste de Europa (Mediterráneo y Atlántico), así como en México. México es un país con 11 592.77 km de extensión litoral, repartidos entre la costa del océano Atlántico (8 475.06 km) y la del Océano Pacífico (3 117.71 km). En estos litorales las zonas estuarino-lagunares representan del 30 al 35% de las áreas costeras (Rivera-Arriaga & Villalobos, 2001; Morán-Silva *et al.*, 2005).

## **2.2 CADENA DEL DETRITUS**

Los estudios sobre ecología energética en sistemas acuáticos demuestran que los ecosistemas costeros reciben energía a partir de dos fuentes principales: luz y materia orgánica, las cuales dan origen a la cadena del pastoreo y a la cadena del detritus, respectivamente. La interrelación entre estas cadenas genera una trama trófica compleja en este tipo de ambientes. Por el hecho de que las zonas estuarino-lagunares son sitios con elevadas tasas de depositación de material orgánico, la cadena del detritus llega a ser más importante inclusive que la cadena del pastoreo. Engler *et al.* (1977) establecen que la fracción constituida por el sedimento, la materia orgánica y los microorganismos asociados a ella, conforman el complejo conocido como detritus.

Puede hablarse de una vía detrítica cuando la materia orgánica muerta no se utiliza inmediatamente con gran rapidez, sino que va siendo paulatinamente atacada y descompuesta a medida que circula a través de diversos compartimentos del ecosistema. El transporte por vía detrítica es especialmente importante en la frontera entre ecosistemas de organización diferente: tierra-mar (playas, marismas, manglares), aguas dulces-aguas marinas (desembocaduras de ríos al océano, estuarios y lagunas costeras con comunidades vegetales extensas), sistemas terrestres-epicontinentales, lagos eutróficos y a lo largo de los ríos (Odum & Heald, 1972).

### **2.3 MATERIA ORGÁNICA**

La materia orgánica se define como el material originado por los organismos vivos, está formada por diversos compuestos químicos basados en cadenas o anillos de carbono e hidrógeno, con o sin oxígeno, nitrógeno u otros elementos (Libes, 1985). La materia orgánica en los sistemas estuarino-lagunares proviene de fuentes autóctonas y alóctonas.

El origen autóctono es toda la biomasa que se produce en la columna de agua del propio ecosistema, principalmente a partir del proceso de producción primaria fitoplanctónica; también se incluyen los compuestos orgánicos que resultan de la degradación de los organismos muertos o la excreción de moléculas sintetizadas por los organismos vivos. El fitoplancton es la fuente predominante de detritus en la

zona pelágica de los océanos y en los lagos profundos, químicamente puede contener más del 50% de proteínas (Hodson *et al.*, 1984; Hedges *et al.*, 2002). La materia orgánica alóctona es la aportada por la vegetación aledaña (manglares y marismas) y sumergida (hidrofitas enraizadas como pastos marinos), también se considera el material de origen terrígeno que es transportado por los ríos, el proveniente de la zona oceánica y las descargas de aguas de desechos resultantes de la actividad antropogénica. Las plantas vasculares y macroalgas representan la fuente más importante del detritus en zonas costeras, lagos someros y ríos; su composición química está definida principalmente por carbohidratos, proteínas y lípidos (90-100%) y pequeñas cantidades de lignina (10-30%) (Wang *et al.*, 1998).

La materia orgánica puede presentarse en forma disuelta o particulada, La materia orgánica particulada (MOP) es la fracción retenida en un filtro de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que la materia orgánica disuelta (MOD) es la fracción que pasa a través del filtro. La MOP incluye organismos vivos y partículas inertes (organismos muertos, detritus y material coloidal); mientras que la MOD está compuesta por la fracción lábil y la refractaria. La fracción lábil o hidrolizable incluye biopolímeros tales como carbohidratos, lípidos y proteínas, los cuales son rápidamente mineralizados por las bacterias, quedando potencialmente disponibles en corto tiempo para los niveles tróficos superiores (Danovaro *et al.*, 1993). Por el contrario, la fracción refractaria o recalcitrante se compone principalmente de polímeros complejos como sustancias húmicas y ácidos fúlvicos que se degradan lentamente y por consiguiente no están disponibles para la trama trófica (Fabiano & Danovaro, 1994).

El contenido de la materia orgánica generalmente se ha cuantificado con base en su contenido de carbono, determinándose que el carbono orgánico disuelto (COD) es la fracción predominante en ríos y océanos, mientras que en estuarios y lagunas costeras domina el carbono orgánico particulado (COP). Asimismo se ha observado que la concentración de carbono orgánico es mayor en los ríos y disminuye hacia las regiones oceánicas.

La materia orgánica tiene un alto contenido energético, el cual en la mayoría de las ocasiones no está disponible de forma directa para la comunidad acuática debido a su complejidad estructural, siendo entonces necesaria su degradación o rompimiento a compuestos sencillos (mineralización). Durante los procesos de mineralización, la materia orgánica experimenta tres clases de rotura:

1. Mecánico. Se produce a través de sacudidas y rodamiento continuo del material por la acción de las olas y corrientes de agua. Los procesos de trituración de varias especies consumidoras también es importante (Darnell, 1967).
2. Ortoquímico. En esta fase hay una pérdida de masa a través de un proceso de lixiviación de las sustancias orgánicas hidrolizables. Generalmente la materia orgánica algal pierde más masa que la de origen vascular. El material altamente hidrolizable se pierde rápidamente en comparación con el recalcitrante, por lo que éste último tiene un tiempo de residencia mayor en los

ecosistemas costeros (Mitsch & Gosselink, 2000).

3. Microbiano. El material orgánico liberado durante el proceso de lixiviación es un complejo de carbohidratos, proteínas y aminoácidos solubles que serán mineralizados por los microorganismos una vez que éstos hayan colonizado dicho material. Robb *et al.* (1979) demostraron que los elementos pioneros de la colonización son los hongos (principalmente en la degradación celulolítica), dando paso posterior a una colonización bacteriana (Odum, 1982). Cabe señalar que aproximadamente del 2 al 10% de la superficie del detritus orgánico es colonizado por bacterias y parece haber un límite en el área disponible para la colonización (Mann, 1982). En ésta, la diversidad de tipos celulares adheridos a una partícula es sorprendentemente elevado, aún cuando las partículas no son ricas en nutrientes (Paerl, 1975). Una vez formado el complejo materia orgánica-microorganismo se inicia la degradación de la misma, principalmente por bacterias.

Las bacterias, por su versatilidad enzimática, degradan cualquier compuesto orgánico producido naturalmente y, la mayoría de los compuestos sintéticos. La descomposición de la materia orgánica involucra reacciones moleculares de segundo orden que están condicionadas por la concentración de los reactivos, los valores del potencial de oxidación y reducción (pH, Eh) y el contenido de los diferentes aceptores de hidrógeno ( $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  y  $CO_2$ ).

## **2.4 MINERALIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA.**

El componente más importante de la materia orgánica es el material de las plantas, conformado básicamente por polisacáridos y lignina; en algunos casos puede haber un aporte considerable de restos animales (principalmente de crustáceos), compuestos fundamentalmente por quitina. Debido a que la lignina es un compuesto recalcitrante de baja solubilidad, se asume que los procesos de mineralización son altamente dependientes de los carbohidratos como el sustrato dominante (Conrad, 1999).

La materia orgánica biogénica depositada en la fase sedimentaria representa una fuente potencial de energía que puede estar disponible para el ecosistema costero ya que es lábil o metaestable (en la mayoría de las condiciones sedimentarias) debido a su disposición para ser degradada hasta formas inorgánicas sencillas, a través de diversos procesos metabólicos efectuados por los microorganismos del ecosistema, cuya actividad es mayor en los sedimentos en comparación con la columna de agua (Burdige, 2002).

Los procesos de mineralización están vinculados con la productividad del ecosistema y la disponibilidad de oxígeno. En ambientes poco productivos (oligotróficos) y con una concentración de oxígeno alta, la degradación es rápida, por lo que no se favorece la acumulación de la materia orgánica. Por el contrario, en sistemas muy productivos (eutróficos) y con zonas de baja o nula concentración de oxígeno, la degradación es lenta (Rullkötter, 2000). Lo anterior provoca que exista una

acumulación de la materia orgánica en el ecosistema, como sucede usualmente en la interfase sedimento-agua y en el sedimento de las lagunas costeras y estuarios.

#### **A. Mineralización aerobia.**

La mineralización de la materia orgánica se realiza en dos zonas: óxica y anóxica. La zona óxica (aerobia) en los ambientes costeros se limita a la columna de agua y los primeros milímetros o centímetros del sedimento (King *et al.*, 1990); también se consideran en ésta las regiones próximas a la rizósfera, donde se encuentran las raíces vivas de las plantas acuáticas.

En la zona óxica, cuando los restos orgánicos quedan inmersos en el agua, las sustancias solubles se pierden por lixiviación. El lixiviado está formado principalmente por aminoácidos, azúcares, ácidos alifáticos volátiles y no volátiles; dichos compuestos son metabolizados rápidamente por la microbiota aerobia del sistema. La degradación posterior del material depende de la relación existente entre los diversos polímeros (lignina, celulosa y hemicelulosa) en los depósitos, su estructura y las características fisicoquímicas del ecosistema (Moran *et al.*, 1989).

La degradación de la materia orgánica en esta zona se efectúa básicamente a través del metabolismo de la respiración aerobia, el cual es responsable del 70 al 80% de la descomposición del material orgánico. Se ha establecido que en el medio aerobio existen diversos microorganismos involucrados con la descomposición del material orgánico, siendo los hongos el grupo de organismos más importantes. En ríos y

lagos los hongos pueden representar hasta el 90% de la biomasa microbiana asociada con los fragmentos de plantas vasculares, mientras que en los restos de la vegetación de marismas y pastos marinos usualmente son el 20%; por el contrario, en bosques de manglar pueden aportar hasta el 80% de la biomasa microbiana total (Blum *et al.*, 1988). Asimismo, destacan las bacterias amilolíticas, proteolíticas y quitinolíticas.

La microbiota aerobia es capaz de incorporar pequeñas moléculas orgánicas que rompen en pequeñas unidades y finalmente oxidan hasta CO<sub>2</sub> en presencia de oxígeno. La respiración aerobia comprende las vías de glucolisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y la cadena de transporte electrónico (Fig. 1); a través de estas rutas se producen aproximadamente -639 kJ/ mol y 38 mol de ATP por cada mol de substrato oxidado; sin embargo, sólo se conserva aproximadamente el 43% de la energía generada, el resto se pierde como calor (entropía). El proceso de la respiración aerobia es muy eficiente en el reciclamiento del carbono (Lehninger, 1980; Madigan *et al.*, 2003).

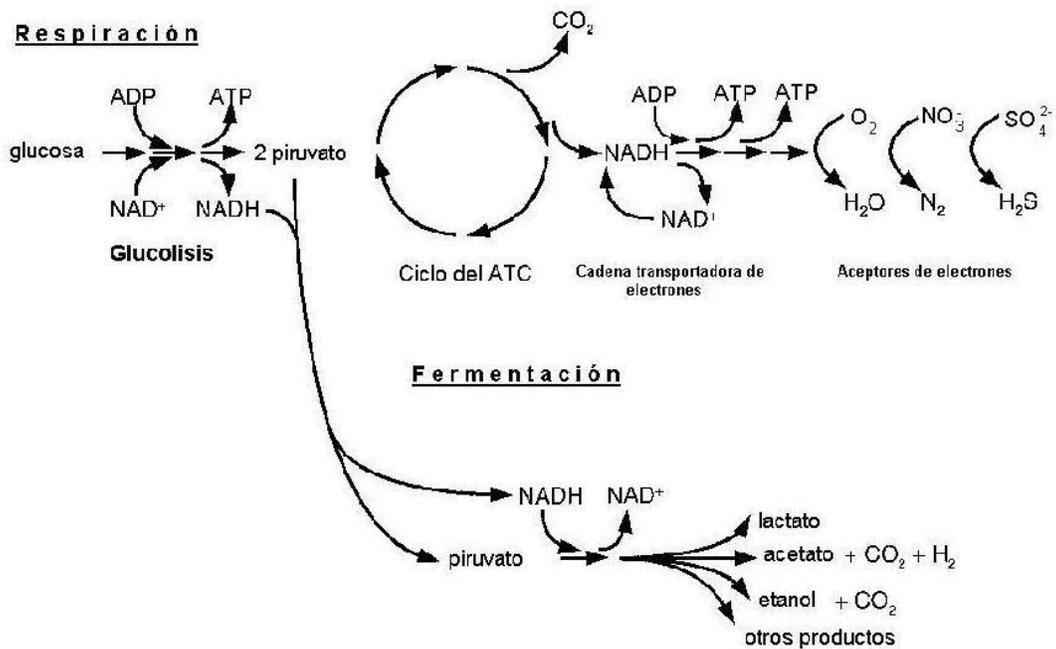


Figura 1. Vías metabólicas implicadas en los procesos de respiración y fermentación (Jørgensen, 2000).

## B. Mineralización anaerobia.

Como resultado de la degradación biológica aerobia, en el sistema se propicia una demanda de oxígeno que supera al aporte del mismo, creándose condiciones generalmente anaerobias y altamente reductoras a una determinada profundidad. Esta profundidad establece el límite entre el metabolismo aerobio y el anaerobio generalmente se sitúa por debajo de la interfase sedimento-agua, aunque en algunos casos se localiza por arriba de dicha interfase y en algunas microzonas adyacentes a las raíces vegetales (Stolzy *et al.*, 1981).

En los sedimentos acuáticos se generan condiciones anaerobias debido a que los espacios entre las partículas del mismo se llenan con agua, disminuyendo drásticamente la difusión del oxígeno, ya que éste en una solución acuosa se difunde 10,000 veces más lento que en el aire. La difusión del oxígeno en los sedimentos es tan lenta que el Eh desciende rápidamente con la profundidad, formándose un fuerte gradiente del potencial redox que influye en la secuencia de reacciones metabólicas que se presentan durante la degradación de la materia orgánica (Stolzy *et al.*, 1981). El potencial redox o de óxido-reducción (Eh) es un término que se utiliza para expresar la tendencia de un medio para aceptar o donar protones, de tal manera que un medio óxico tiene un Eh alto (positivo) porque tiene oxígeno disponible como el aceptor de electrones. Por el contrario, los Eh bajos (negativos) indican la presencia de aceptores de electrones diferentes al oxígeno.

En condiciones anaerobias, el primer paso involucrado en la degradación del carbono orgánico es la fermentación, en la cual la materia orgánica por sí misma es el aceptor terminal de electrones, formándose diversos ácidos orgánicos y alcoholes de bajo peso molecular como el ácido láctico y el etanol, respectivamente (Fig. 1). En un principio las bacterias fermentadoras excretan enzimas que hidrolizan los polisacáridos. El mismo grupo de bacterias convierte los monómeros resultantes en alcoholes, ácidos grasos e hidrógeno (H<sub>2</sub>). Estos sustratos, en presencia de diversos aceptores de electrones, pueden ser degradados completamente hasta CO<sub>2</sub>. Cuando hay limitación de aceptores de electrones externos, las bacterias sintróficas degradan los alcoholes y ácidos grasos hasta acetato, formiato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Una ruta alternativa

a las anteriores involucra la conversión directa de los monómeros hasta acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por medio de la actividad de las bacterias homoacetogénicas y las bacterias sulfatorreductoras, que oxidan de manera incompleta los ácidos grasos (Fig. 2).

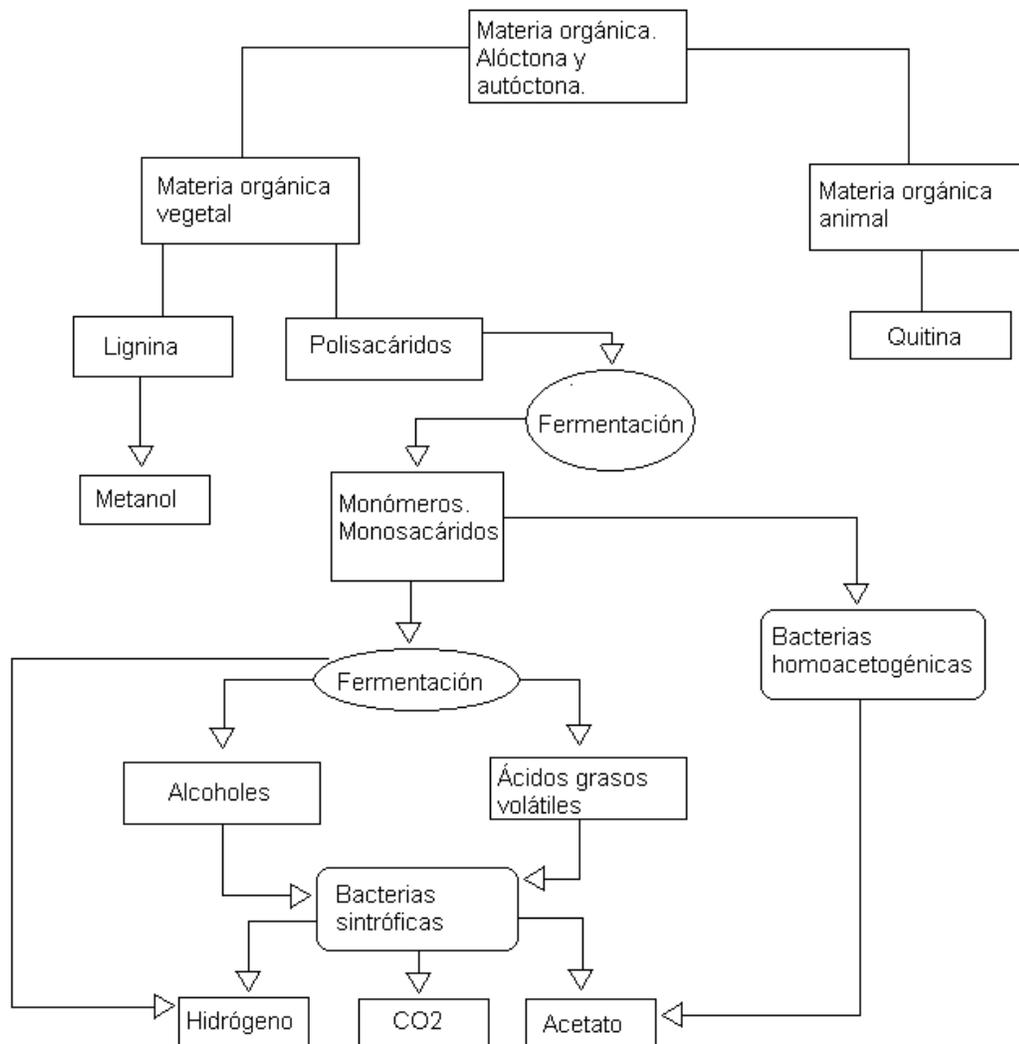


Figura 2. Mecanismos de fermentación y homoacetogénesis relacionados con la degradación de la materia orgánica.

Después de la fermentación, la mineralización de la materia orgánica procede a través de la utilización de diferentes aceptores de electrones. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es el primer aceptor de electrones que se reduce, seguido por el manganeso (Mn IV), hierro (Fe III), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Los oxidantes ( $\text{NO}_3^-$ , Fe(III), Mn(IV),  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{CO}_2$ ) son utilizados por diversas comunidades bacterianas en una secuencia que está determinada por factores termodinámicos relacionados con el gradiente de potencial redox (Fig. 3).

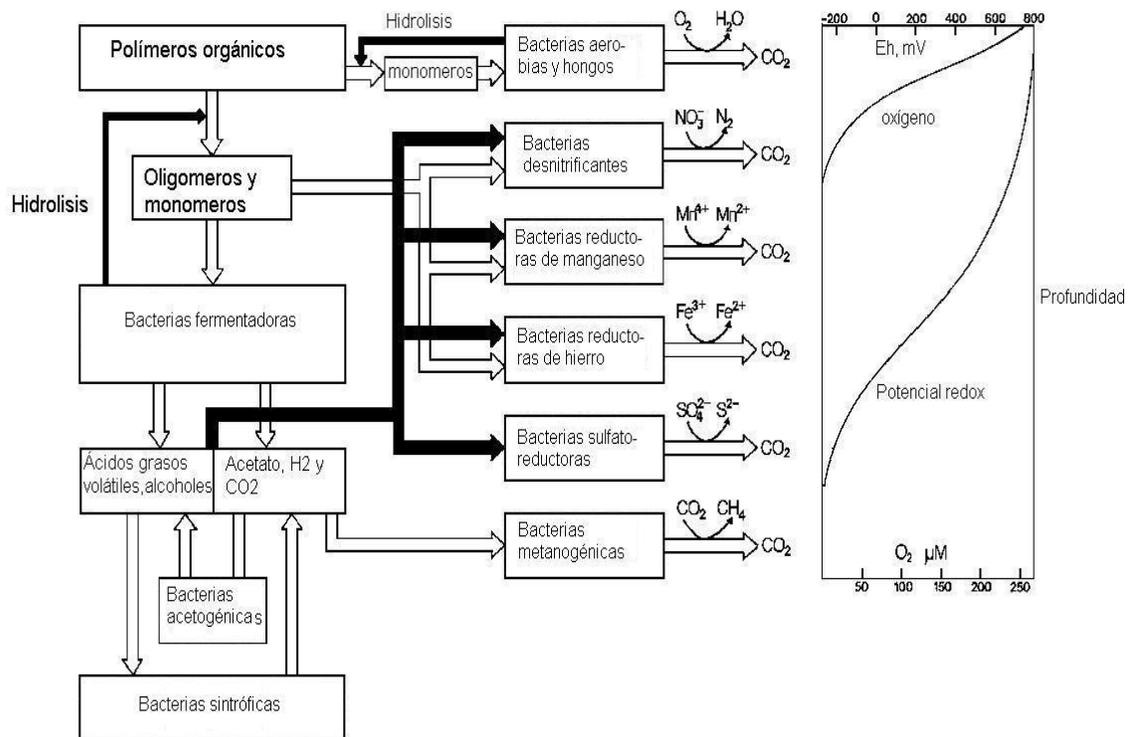


Figura 3. Mineralización de la materia orgánica en los sedimentos de humedales (Howarth, 1993; Westermann, 1993).

1. Desnitrificación. Este proceso comienza cuando la concentración de oxígeno es

menor a 10  $\mu\text{M}$  y el intervalo de Eh está entre +250 y +350 mV (Wang & Patrick Jr., 1999). Las bacterias que lo llevan a cabo son anaerobios Gram negativos capaces de utilizar los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) como aceptores terminales de electrones durante la degradación de la materia orgánica, liberando óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) como producto intermedio y nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) como producto final. Hay también algunas bacterias que en lugar de reducir los nitratos, reducen los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) hasta amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Las especies más comunes que llevan a cabo la desnitrificación pertenecen al género *Pseudomonas*, aunque también se han reportado especies de los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Alcaligenes* (Struwe & Kjoller, 1989).

Como el nitrato se presenta únicamente en el estrato superficial de los sedimentos, al aumentar la profundidad se limita su disponibilidad como aceptor de electrones, por lo que la zona que ocupan las bacterias desnitrificantes es estrecha y restringida (Mechalas, 1974). Aunque este mecanismo es de menor importancia en la mineralización de la materia orgánica, puede generar  $-453$  kJ/mol de energía y constituye un factor importante relacionado con la pérdida de nitrógeno en el ambiente, porque el producto final se difunde a la atmósfera (Sørensen *et al.*, 1979).

2. Reducción del manganeso. Es la transformación del  $\text{Mn}^{3+}$  a  $\text{Mn}^{4+}$  que comienza por debajo de los +526 mV, es efectuada por una gran diversidad de bacterias

facultativas y microhongos. La reducción del Mn aparentemente es un proceso de menor importancia en la mineralización de la materia orgánica, excepto en aquellas zonas donde las concentraciones de los óxidos de Mn son elevadas, como en la cuenca de Panamá (Canfield, 2005).

3. Reducción del hierro. Este proceso se lleva a cabo cuando el Eh desciende entre 0 y -47 mV. Participan varios microorganismos facultativos del grupo *Shewanella-Ferromonas-Aeromonas* que acoplan la reducción del metal con la oxidación del hidrógeno o con la oxidación incompleta del lactato a acetato. Asimismo están los integrantes del grupo Geobacteraceae que son anaerobios obligados o microaerofílicos, quienes efectúan la oxidación completa del acetato hasta CO<sub>2</sub> (Canfield, 2005). Se ha determinado en sedimentos dulceacuícolas, en la zona de la rizosfera, que la reducción del Fe(III) representa el 65% del metabolismo total del carbono, en comparación con la metanogénesis, que abarca el 22% (Roden & Wetzel, 1996). El hierro puede ser un aceptor de electrones importante durante la oxidación del carbono orgánico en zonas costeras donde los procesos de bioturbación de la infauna y las raíces de las macrofitas proporcionan un potencial de reoxidación considerable en los sedimentos (Kostka *et al.*, 2002).

La manganeso-reducción y la reducción del hierro se han estudiado poco, pero al parecer son procesos importantes cuando hay aportes considerables de minerales al medio (Lovley, 1991; Canfield *et al.*, 1993).

4. Sulfatorreducción. Este metabolismo es efectuado por las bacterias sulfatorreductoras, las cuales utilizan sulfatos ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) como aceptor terminal de electrones, por lo que son las poblaciones dominantes implicadas en la oxidación anaerobia terminal de la materia orgánica en sedimentos marinos y costeros donde este compuesto es abundante. La sulfatorreducción en dichos ecosistemas es equivalente cuantitativamente a la respiración aerobia, excediéndola en algunos casos (Jørgensen, 1982). En los sedimentos donde se registra la sulfatorreducción, las bacterias responsables de este proceso se localizan principalmente en los primeros centímetros (e incluso milímetros) de la columna sedimentaria, donde existe un contenido elevado de materia orgánica y potenciales redox inferiores a  $-120$  mV (Teske *et al.*, 1998).
  
5. Metanogénesis. Las arqueas metanogénicas catalizan el último paso de la degradación anaerobia de la materia orgánica, dando como resultado la formación de metano ( $\text{CH}_4$ ) y  $\text{CO}_2$ , los cuales son gases importantes involucrados en el efecto invernadero que se relaciona con el cambio climático global. Esta fase de la degradación anaerobia se lleva a cabo cuando la concentración de sulfatos disminuye, como sucede por ejemplo, por debajo de la zona de sulfatorreducción. El proceso requiere de potenciales redox inferiores a  $-244$  mV (Peters & Conrad, 1996).

La importancia de los procesos metabólicos en los ambientes costeros en particular

depende de la concentración de los aceptores de electrones específicos y de la cantidad de materia orgánica disponible. Por ejemplo, en las zonas de marismas, todos los procesos (excepto la metanogénesis) presentan tasas elevadas aunque se encuentran separadas espacialmente en diferentes estratos o micronichos (Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de respiración (g C/m<sup>2</sup>/año) en dos zonas de marismas (Howarth, 1993).

<b>Proceso</b>	<b>Marismas en Isla Sapelo</b>	<b>Marismas en Sippewissett</b>
Respiración aerobia	390	390
Desnitrificación	10	3
Reducción de Fe y Mn	Traza	Traza
Sulfatorreducción	850	1800
Metanogénesis	40	1-8

En los sedimentos de medios acuáticos las bacterias sulfatorreductoras y las productoras de metano ocupan nichos similares en los estados terminales de la mineralización anaerobia de la materia orgánica y desempeñan un papel clave en el consumo de los productos metabólicos generados por los organismos que las preceden en dicha descomposición. El consumo de tales productos por estos grupos terminales está influido por el tipo de sustancias liberadas por las reacciones previas de fermentación, mejorando la conservación de la energía de las bacterias

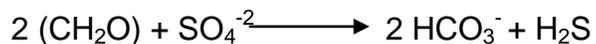
fermentadoras y manteniendo las condiciones termodinámicas que se requieren para el catabolismo de los ácidos grasos volátiles.

La sulfatorreducción es el proceso dominante en la descomposición de la materia orgánica en sedimentos caracterizados por la presencia de sulfatos. Su importancia es tal, que llega a mineralizar aproximadamente el 11% de la producción primaria neta de la columna de agua (Aller & Yingst, 1980), mientras que sólo el 5% del carbono fijado en la fotosíntesis es convertido a metano (CH<sub>4</sub>) (Vogels, 1979).

## **2.5 BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS.**

### **1. Características y metabolismo.**

Las bacterias sulfatorreductoras (BSR) son anaerobias obligadas, aunque se han detectado también algunas especies en ambientes aerobios (Battersby *et al.*, 1985). Las células de este grupo presentan un amplio intervalo de formas morfológicas: bacilos, vibrios, cocos, sarcinas y filamentos. Las BSR utilizan principalmente sulfato como el aceptor terminal de electrones reduciéndolo a sulfuro, el cual es posteriormente convertido hasta ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en presencia de iones hidrógeno (H<sup>+</sup>) externos:



Los productos resultantes de la sulfatorreducción generalmente se dividen en una fracción de ácidos volátiles (H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup>, S<sub>2</sub><sup>-</sup> y FeS) y en una de ácidos no volátiles

(FeS<sub>2</sub>, S<sup>0</sup>) y sulfuro orgánico (Krairaponond *et al.*, 1991).

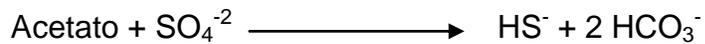
Las BSR obtienen su energía a partir de la oxidación de sustratos orgánicos y del gas hidrógeno. Las BSR utilizan los ácidos grasos volátiles como donadores de electrones, así como compuestos fenólicos, indólicos y aminoácidos (Bak & Widdel, 1986; Gibson, 1990). Con base en sus capacidades oxidativas y metabólicas, se pueden dividir en dos grupos. El primero incluye aquellas especies que metabolizan de manera incompleta los ácidos grasos de cadena larga y corta: propionato, lactato y piruvato, hasta acetato:



Los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* y *Desulfomonas* pertenecen a este grupo. Las especies del género *Desulfovibrio* son bacilos o vibrios móviles, no formadores de esporas. Las especies del género *Desulfotomaculum* son bacilos formadores de esporas.

El segundo grupo comprende aquellas especies que llevan a cabo la oxidación completa de los ácidos orgánicos como lactato, acetato, benzoato, succinato o fumarato hasta CO<sub>2</sub>. En este grupo se ubican los géneros *Desulfonema* y

*Desulfobacter*. El primero incluye bacterias que presentan movilidad y son las únicas BSR Gram-positivas (Pfennig *et al.*, 1981); mientras que las especies del género *Desulfobacter* no forman esporas:



La importancia relativa de los sustratos para la sulfatorreducción depende del ambiente en particular, así como del aporte y composición química del material orgánico. Parkes *et al.* (1989) determinaron que el acetato representa el sustrato utilizado del 35.5 al 100% de la sulfatorreducción en ambientes estuarinos y marinos, seguido por el lactato con un 43% y el propionato con un intervalo del 6 al 12.5%. Varias BSR pueden crecer fermentativamente o en una relación simbiótica con las arqueas metanogénicas que utilizan hidrógeno cuando los sulfatos están ausentes (Widdel, 1988).

Las regiones anaerobias de los sedimentos marinos y estuarinos, por su alto contenido de sulfatos, son el hábitat característico de las BSR (Jørgensen, 1977; Howarth & Teal, 1979). Las BSR son las responsables de degradar aproximadamente entre el 36% al 50% de la materia orgánica presente en los ambientes marinos (Jørgensen, 1982; Howes *et al.*, 1984); mientras que en los humedales salobres, particularmente en zonas de marismas, mineralizan entre el 67-80% de la misma (Howarth, 1993). Las BSR también se han encontrado en hábitats

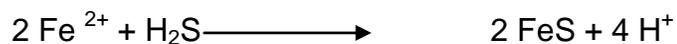
particulares como limos de sistemas contaminados, digestores para aguas de desecho, suelos inundados (arrozales) y en heces fecales de animales y del hombre. En estos hábitats ricos en sustancias orgánicas fermentables, el crecimiento de las BSR únicamente se encuentra limitado por la disponibilidad del sulfato (Ueki *et al.*, 1980; Isa *et al.*, 1986; Gibson *et al.*, 1988; Visser *et al.*, 1993).

## 2. Importancia de la sulfatorreducción.

La liberación de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) a partir de la actividad sulfatorreductora tiene diversas implicaciones, tanto ecológicas como económicas. Desde la perspectiva ecológica, pueden presentarse impactos químicos y biológicos.

Impacto químico.

1. Precipitación de sulfuros ferrosos. El hierro es uno de los metales pesados más abundantes en el suelo, los sedimentos y en el agua. En presencia del H<sub>2</sub>S la mayoría de los minerales férricos insolubles son reducidos hasta producir sulfuro ferroso de color negro, que precipita:



el sulfuro ferroso reacciona lentamente con el azufre elemental para formar finalmente pirita:



En las zonas costeras donde la tasa de sulfatorreducción es elevada, la mayor cantidad de  $\text{H}_2\text{S}$  se difunde al estrato aerobio y aproximadamente sólo el 1% termina como sulfuro ferroso (Jørgensen, 1977).

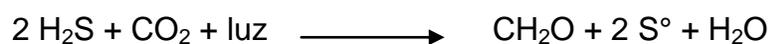
2. Movilización de nutrientes. En los sistemas acuáticos existen los denominados nutrientes, que son formas inorgánicas del nitrógeno (amonio, nitratos y nitritos) y del fósforo (fosfatos), los cuales son utilizados por los productores primarios para su desarrollo durante la fotosíntesis. Dichos nutrientes están tanto en el agua como en el sedimento y es aquí, donde generalmente se produce una absorción de los mismos, principalmente los fosfatos tienden a unirse con el hidróxido de hierro  $\text{FeO}(\text{OH})$  formando un complejo de hierro-fosfato ( $\text{FePO}_4$ ) que precipita (Patrick & Khalid, 1974; Boström *et al.*, 1982). Cuando se presenta dicho mecanismo hay una limitación del fósforo disponible para los productores primarios en el sistema. No obstante lo anterior, este complejo puede disolverse con el  $\text{H}_2\text{S}$ . El sulfuro de hidrógeno forma un enlace con el hierro del complejo  $\text{FePO}_4$  para constituir el sulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ ), que precipita y provoca la liberación de fosfato inorgánico ( $\text{PO}_4$ ):



Esta reacción es dependiente de la cantidad de hierro existente, ya que cuanto más H<sub>2</sub>S se encuentre en el sistema, más hierro disuelto se requerirá para la reacción. Cuando la entrada de hierro al ecosistema es insuficiente en comparación con la tasa de producción de H<sub>2</sub>S, se alcanzan valores críticos de éste, dando como resultado una acumulación del mismo y la movilización del fosfato (Smolders & Roeolfs, 1993). Por consiguiente, el H<sub>2</sub>S es un compuesto necesario para la movilización del fosfato, siendo un factor importante que contribuye al movimiento de nutrientes inorgánicos del sedimento hacia las zonas aerobias (Jørgensen & Fenchel, 1974; Patrick & Khalid, 1974).

Impacto biológico.

1. Utilización del producto por diversas poblaciones microbianas. En los sedimentos marinos y costeros, aproximadamente el 90% del H<sub>2</sub>S puede estar disponible para ser utilizado por diferentes poblaciones de bacterias para su crecimiento. En condiciones anaerobias el H<sub>2</sub>S es utilizado como donador de electrones por las bacterias fototróficas, como las sulfurosas púrpuras de los géneros *Chromatium* y *Thiocapsa*, y las sulfurosas verdes de los géneros *Chlorobium* y *Pelodictyon*. El mecanismo de la “fotosíntesis anaerobia”, se presenta cuando la luz tiene acceso a la zona anóxica:



En los sedimentos con altos contenidos de materia orgánica y, donde la luz alcanza a penetrar, se desarrollan las bacterias púrpuras y verdes en altas densidades, dando como resultado áreas con un color rosa, púrpura y verde (Kohler *et al.*, 1984).

Cuando el H<sub>2</sub>S se difunde hacia la zona aerobia, diversos microorganismos son capaces de emplearlo en los estratos donde el oxígeno y el sulfuro de hidrógeno coexisten, es decir en la zona de transición entre el ambiente anóxico-oxico localizado en la superficie sedimentaria. En esta región las bacterias que utilizan el H<sub>2</sub>S deben competir con el oxígeno por la oxidación del mismo. Las bacterias sulfurosas incoloras son los microorganismos capaces de emplear la energía que queda disponible durante la oxidación del sulfuro de hidrógeno; entre éstas se incluyen las especies de los géneros *Thiobacillus* y *Beggiatoa*, que forman azufre intra y extracelular a partir de la oxidación del H<sub>2</sub>S (Nelson & Jannasch, 1983; Griffiths, 1996).

2. Toxicidad. Cuando la concentración de H<sub>2</sub>S llega a ser elevada, éste se acumula hasta alcanzar concentraciones tóxicas en el sedimento. El H<sub>2</sub>S en concentraciones elevadas puede cancelar la incorporación de nutrientes por los vegetales provocando su muerte (Train, 1979). Se ha establecido que el H<sub>2</sub>S es un inhibidor de la respiración animal, aunque la mayoría de los organismos pueden tolerar de 1-2 mg H<sub>2</sub>S/l, algunos son altamente sensibles y sólo toleran de 0.3-0.5 mg H<sub>2</sub>S/l (Tölgyessy, 1993). Asimismo, se hace evidente que los organismos bentónicos son más

tolerantes al ácido sulfhídrico que los animales pelágicos.

Impacto económico.

1. Corrosión. La producción de  $H_2S$  merece especial atención en la industria por su relación con la corrosión anaerobia. Por corrosión se entiende el ataque destructivo de un metal a través de reacciones químicas o electroquímicas con el ambiente. La corrosión microbiana de los metales (sobre todo hierro, cobre, aluminio, acero templado y acero inoxidable) es el resultado de la liberación de metabolitos corrosivos, como ácidos, que se producen durante la actividad metabólica de los microorganismos. El proceso biológico generalmente se lleva a cabo por películas de microorganismos adheridas a diversas superficies (biofilms); estas películas están compuestas por una microbiota heterogénea que abarca comunidades aerobias, microaerófilas y anaerobias. De todos estos microorganismos los más importantes son las BSR.

Existen diferentes explicaciones acerca de los mecanismos microbiológicos involucrados en la corrosión, sin embargo, la explicación más aceptada se basa en la teoría de la despolarización catódica de von Wolzogen y van der Vlugt (1934): el metal se polariza en el agua por la pérdida de sus iones positivos (reacción anódica), mientras se establece un equilibrio, el hidrógeno molecular liberado permanece en la superficie metálica. El hidrógeno entonces es utilizado como sustrato por las BSR que lo eliminan de manera permanente a través de su oxidación con el sulfato

(despolarización catódica), por lo tanto se presenta una oxidación neta del metal. Si además en el medio están presentes compuestos orgánicos como donadores de electrones, continua la sulfatorreducción, que conduce a formar más ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro produciendo sulfuro ferroso, un precipitado de color negro.

La teoría de la despolarización de superficies ferrosas ha sido comprobada experimentalmente, encontrándose que las especies del género *Desulfovibrio* pueden ocasionar la despolarización debido a su alta afinidad por el hidrógeno; en este caso se determinó que la oxidación de 4 moles de hierro puede producir 1 mol de sulfuro de hidrógeno que precipita 1 mol de sulfuro ferroso. Este sulfuro es el responsable de la corrosión de bombas, tanques y estructuras sumergidas (Tanner, 1989). Otro tipo de corrosión vinculada con la actividad de las BSR puede ocurrir en zonas con condiciones aerobias/anaerobias intermitentes, donde el ácido sulfhídrico producido reacciona con el oxígeno, generando ya sea polisulfuro o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), los cuales son altamente corrosivos (Hamilton, 1985).

## **2.6 ARQUEAS METANOGÉNICAS.**

### **1. Características y metabolismo.**

Las arqueas metanogénicas (AM) son miembros del dominio Archaea. Abarcan un grupo de procariontes único y morfológicamente diverso, contienen bacilos cortos o largos, cocos, espirilos y varios arreglos de estas formas básicas en largas cadenas

o agregados. En general sus células poseen paredes celulares complejas con estratos que contienen glucoproteínas y la membrana celular posee una elevada proporción de lípidos con tetraéteres. Todos los miembros poseen dos cofactores únicos, el factor 420 (F420) y el ácido 2-mercaptoetanosulfónico (coenzima M o CoM) (Mah & Smith, 1981).

Las AM son anaerobios obligados y mientras la mayoría son mesófilas, las especies marinas incluyen psicrófilas, termófilas e hipertermófilas. Son abundantes en los sedimentos acuáticos de lagos eutróficos y en diversos humedales dulceacuícolas como tundras, histosoles, turberas minerotróficas y pantanos (Ward & Olson, 1980; Sørensen *et al.*, 1981). Asimismo, se encuentran en el rumen de algunos animales, en el intestino largo de los mamíferos, en las cavidades orales del hombre, en el estómago de las ballenas, en el picoplancton marino y en las chimeneas hidrotermales (Aravalli *et al.*, 1998).

Son un grupo diverso formado por cinco órdenes, subdivididos en 11 familias y 25 géneros. Los órdenes son Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanopyrales (Boone *et al.*, 1993).

Las AM tienen la capacidad para producir un hidrocarburo, el metano (CH<sub>4</sub>) a partir de diferentes sustratos. Metabólicamente se clasifican en cuatro grupos fisiológicos:

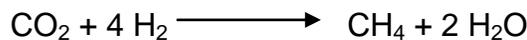
1. Los géneros que exclusivamente emplean acetato como sustrato, por ejemplo

*Methanosaeta*:



La metanogénesis a partir de acetato representa el 69% del total en estuarios mareales (0.69-8.54  $\mu\text{M CH}_4/\text{h}$ ) y el 51% en zonas de turberas (0.40-3.41  $\mu\text{M CH}_4/\text{h}$ ).

2. Los géneros que utilizan formiato y la reducción del hidrógeno con  $\text{CO}_2$ , entre ellos están *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* y *Methanogenium*:



Las AM hidrogenofílicas se encuentran asociadas simbióticamente con los anaerobios que producen hidrógeno y contribuyen a mantener niveles bajos de este gas durante el flujo de carbono. Generalmente en pH neutros, la metanogénesis a partir de acetato es la ruta dominante implicada en la producción de metano, seguida por la reducción de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, en condiciones ácidas, el hidrógeno al parecer es un precursor importante del metano, llegándose a cuantificar una abundancia de AM hidrogenofílicas de  $3 \times 10^7$  células/g ST (Horn *et al.*, 2003).

3. Los géneros que se desarrollan a partir de compuestos metilados (metanol y metilaminas), entre ellos *Methanlobus* y *Methanococcus*:



4. Los generalistas, que forman  $\text{CH}_4$  a partir de acetato,  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  y compuestos metilados, como sucede con el género *Methanosarcina* (García, 1990).

La tasa de producción de metano varía dependiendo de la influencia de las variables ambientales sobre las poblaciones de las AM. Los efectos de diversas variables sobre la metanogénesis incluyen la respuesta a la temperatura de las diferentes poblaciones metanogénicas (Conrad *et al.*, 1987; Schulz *et al.*, 1997); la competencia por sustratos entre las AM y otras poblaciones bacterianas, así como la disponibilidad de los mismos (Lovley & Klug, 1986), el aporte de sulfatos y la composición sedimentaria (Yavitt & Lang, 1990).

A pesar de que la metanogénesis no es dominante en la fase terminal de la mineralización anaerobia en sedimentos costeros y marinos, es responsable del 5 al 10% de la mineralización del carbono y se ha reportado la presencia de un número elevado de AM en éstos (Canfield *et al.*, 1993; Purdy *et al.*, 2002). En dichos ambientes, debido a que las BSR pueden competir con mayor eficiencia con las metanogénicas por el acetato o el hidrógeno, éstas últimas optan por utilizar sustratos no sujetos a competencia como el metanol y las metilaminas, llegándose a determinar que la formación de metano a partir de metanol representa del 2.8-4.0%

(Lovley & Klug, 1983; Oren, 1988).

## **2. Importancia de la metanogénesis.**

Impacto químico.

1. Estabilidad sedimentaria. La producción *in situ* del gas metano se relaciona con la estabilidad de los sedimentos no consolidados directamente por el atrapamiento de burbujas de gas en éstos, e indirectamente por la iniciación de ciertas características diagenéticas como la cementación de carbonatos y la formación de nódulos (Whelan, 1974).

2. Metano como gas de efecto invernadero. Una cantidad considerable del metano de origen biogénico es emitido hacia la atmósfera por medio de procesos de difusión, ebullición de burbujas o a través del sistema vascular de las plantas, el cual actúa como un conductor (Tyler, 1991). El metano que se difunde hacia la atmósfera, participa en el efecto invernadero (Karl & Tilbrook, 1994). El efecto invernadero es un proceso natural y vital para el desarrollo de la vida en la Tierra. En éste los rayos infrarrojos provenientes del sol entran a la atmósfera terrestre y alcanzan la superficie de la Tierra para ser posteriormente reflejados. Los gases presentes en la atmósfera, bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y ozono (O<sub>3</sub>), atrapan esta radiación cuando es reflejada, ayudando a mantener caliente la Tierra con una temperatura global promedio que permite el desarrollo de los procesos biofísicos. El efecto de calentamiento producido por un gas se relaciona

con su concentración y permanencia en la atmósfera, así como con su fuerza radioactiva. En este sentido, el metano es 20 veces más efectivo como gas de efecto invernadero porque tiene una mayor capacidad de absorción de la radiación infrarroja que el bióxido de carbono, por lo cual la adición de un kilogramo de metano a la atmósfera bloquea con mayor capacidad el calor emitido por la superficie terrestre que un kilogramo de bióxido de carbono (Ritchie *et al.*, 1997).

Debido a que en los últimos años se ha registrado un aumento en las concentraciones de los principales gases con efecto invernadero en la atmósfera, se ha propiciado un incremento de la temperatura promedio de la Tierra. Este fenómeno se conoce como el Cambio Climático Global por los efectos que produce en el clima terrestre. La modificación de los patrones de precipitación y evaporación, así como la expansión térmica de los océanos que derrite los glaciares e incrementa el nivel del mar produciendo inundaciones, son consecuencia del Cambio Climático Global.

Impacto biológico.

1. Utilización del producto por diversas poblaciones microbianas. Una fracción del metano que se genera, aproximadamente del 10 al 30%, es utilizado como fuente de energía por las bacterias metanotróficas u oxidantes del CH<sub>4</sub> (BOM) y por las nitrificantes, ambos grupos microbianos son aerobios estrictos (Higgins *et al.*, 1981; Lidstrom, 2001). Las BOM y las nitrificantes oxidan el metano hasta CO<sub>2</sub>, utilizando oxígeno como aceptor de electrones y liberando metanol como producto intermedio.

Las bacterias metanotróficas son Proteobacterias Gram negativas que poseen cantidades importantes de esteroides en sus células, en este grupo se incluyen las especies de los géneros *Methylobacter* y *Methylocystis* (Zehnder & Brock, 1979; Higgins *et al.*, 1981; Lidstrom, 1983). Estos microorganismos pueden vivir a expensas de compuestos orgánicos con un solo átomo de carbono como fuente única de energía, generando biomasa bacteriana. Las bacterias nitrificantes pueden oxidar el CH<sub>4</sub> en los suelos y sedimentos debido a su alta afinidad por dicho gas (Bedard & Knowles, 1989). Estas poblaciones bacterianas oxidan el metano bajo condiciones limitantes de nitrógeno. La oxidación del metano requiere de una temperatura óptima de entre 25 y 37°C y es un proceso que demanda del 58-64% del oxígeno presente en el medio, esta alta tasa de oxidación indica que las bacterias metanotróficas pueden competir exitosamente con las bacterias nitrificantes por el oxígeno disponible (Steengergen *et al.*, 1993).

El metano también puede ser oxidado bajo condiciones anaerobias por algunas AM, quienes son capaces de emplearlo como fuente de carbono reducido (Blair & Aller, 1995). La oxidación anaerobia del metano se lleva a cabo por al menos dos grupos filogenéticamente diferentes de arqueas, las ANME-1 y las ANME-2. Éstas generalmente forman consorcios con las BSR, donde el metabolismo del consorcio involucra una relación sintrófica basada en la transferencia de electrones interespecífica (Valentine, 1991). Aparentemente las arqueas oxidan el metano y los

compuestos resultantes son utilizados por las BSR. La oxidación anaerobia del metano (OAM) es importante biogeoquímicamente porque ayuda a reducir la emisión de metano a la atmósfera.

Impacto económico.

1. Formación de clartratos. El metano que se produce en los sedimentos con profundidades superiores a los 10 m, como las grandes trincheras oceánicas, no alcanza la atmósfera, por lo que en dichos ambientes se presenta una saturación con este gas. El metano y otras sustancias que normalmente son gaseosas bajo las condiciones de la superficie terrestre, no lo son en condiciones de alta presión y baja temperatura, bajo éstas suelen combinarse con el agua para formar compuestos cristalinos semejantes al hielo (hidratos de metano o clartatos). Los hidratos de metano son estables a una presión superior a las 26 atm, equivalente a una columna de agua de 260 m.

En la figura 4 se esquematiza el ciclo del metano en los sistemas marinos.

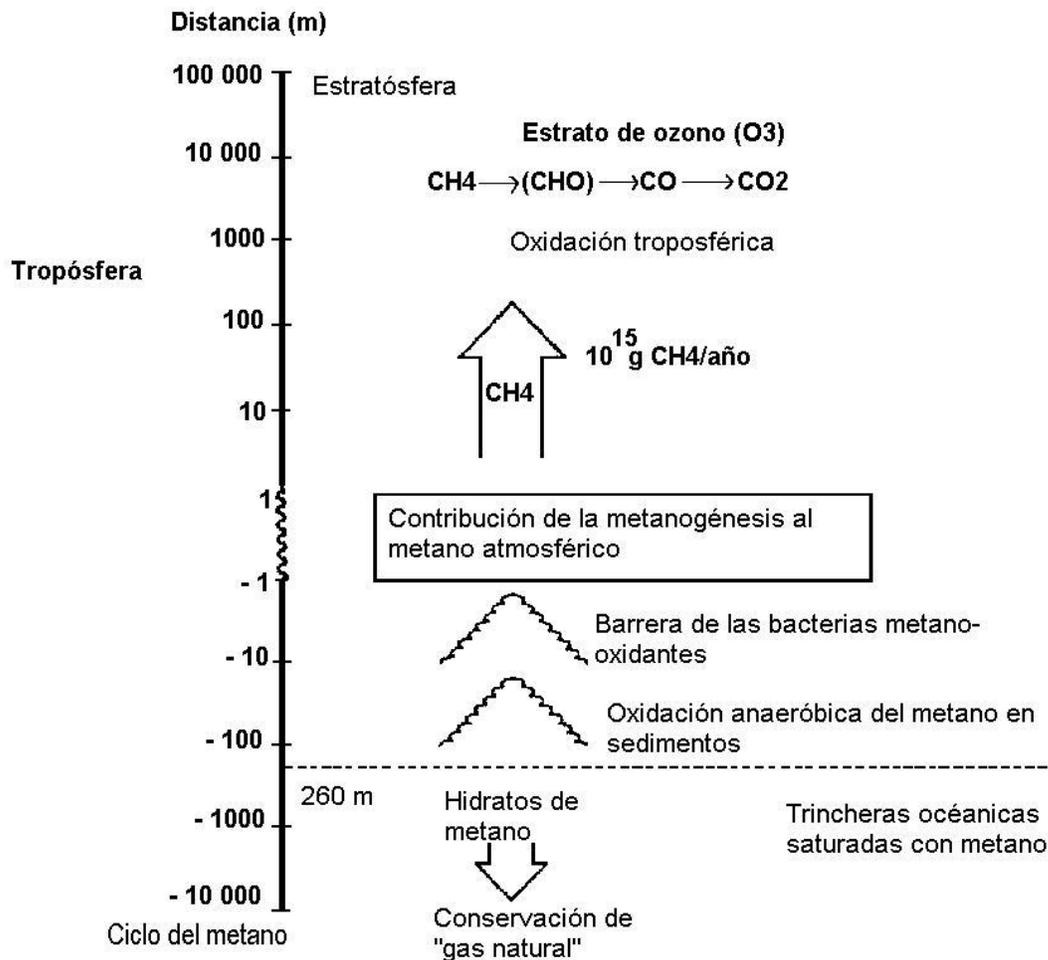


Figura 4. Ciclo del metano (Vogels, 1979).

2. Gas natural. El gas metano tiene enormes ventajas como combustible, ya sea para uso doméstico, en automotores y en otros procesos criogénicos (Yen & Tang, 1977). El incremento en el costo de los combustibles fósiles hace que la metanogénesis sea un proceso económicamente más competitivo.

3. Tratamiento de aguas residuales. La metanogénesis es un proceso importante que se utiliza para el tratamiento de diferentes desechos tóxicos, orgánicos, agrícolas e industriales.

## **2.7 INTERACCIONES ENTRE LA MICROBIOTA**

En los ambientes aerobios, los microorganismos heterótrofos son capaces de efectuar la mineralización completa del carbono orgánico hasta  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, en ecosistemas anaerobios la mineralización es más compleja y requiere de la interacción de un gran número de diferentes grupos microbianos, donde cada uno efectúa una oxidación parcial del carbono orgánico disponible y sus productos metabólicos resultantes son entonces asimilados por los siguientes integrantes de la cadena alimenticia hasta que la oxidación completa concluya. Como resultado de lo anterior, entre los microorganismos se desarrollan un gran número de consorcios y asociaciones sintróficas.

Un ejemplo de lo anterior se presenta con la relación existente entre los fermentadores, los reductores obligados de protones y las arqueas metanogénicas a través del consumo de  $\text{H}_2$ , proceso conocido como "transferencia de hidrógeno entre-especies", el cual permite mantener una presión baja de hidrógeno en el medio, facilitando al mismo tiempo el catabolismo de los productos menores de la fermentación (propionato, valerato, butirato) hasta acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , con liberación de energía.

Las interrelaciones existentes entre la microbiota anaerobia generan ambientes biogeoquímicos diferentes, cada uno caracterizado por una forma de metabolismo respiratorio dominante. Dichos ambientes o estratos están caracterizados por mecanismos metabólicos sucesivamente menos eficientes, en cada uno de ellos la población microbiana dominante explota el medio ambiente y crea uno nuevo que favorece a otras especies. La profundidad que abarcan cada uno de los procesos anaerobios está condicionada por diversos factores, entre ellos: temperatura, salinidad, potencial de óxido-reducción, pH, concentración de nutrientes y, principalmente, por la disponibilidad de los donadores y aceptores de electrones (Fey & Conrad, 2000).

En las lagunas costeras, donde hay un aporte constante de sulfatos, la zona de sulfatorreducción llega a ser dominante y se localiza por encima del estrato metanogénico, el cual se desplaza a mayor profundidad (Fig. 5). Este comportamiento es el resultado de la competencia que se presenta entre las BSR y las AM por el acetato y el hidrógeno, aunque estos grupos bacterianos pueden utilizar otros sustratos como donadores de electrones (Laanbroek & Pfennig, 1981). La dominancia cuantitativa de la sulfatorreducción en los ambientes costeros obedece a que la presencia de sulfatos previene la acumulación de metano, ya que durante la competencia, la sulfatorreducción se ve favorecida cinética y termodinámicamente debido a que produce más energía por mol de hidrógeno o acetato en comparación con la formación de metano (Kristjansson *et al.*, 1982; Lovley *et al.*, 1982; Schönheit *et al.*, 1982). También influye el hecho de que como

durante el proceso de sulfatorreducción se libera sulfuro de hidrógeno, cuando la concentración de éste llega a ser elevada se inhibe la metanogénesis (Cappenberg, 1974, 1975), aunque algunos autores han reportado la existencia de AM tolerantes a elevadas concentraciones de sulfuros (Oremland, 1975; Mountfort & Asher, 1979).



Figura 5. Zonación vertical de los procesos de producción y mineralización de la materia orgánica en ambientes costeros.

## **2.8 ORGANISMOS DETRITÓFAGOS.**

Los microorganismos al efectuar el rompimiento de los materiales orgánicos, liberan hacia la columna de agua nutrientes inorgánicos que pueden ser asimilados por los organismos autótrofos presentes en el ecosistema y producen al mismo tiempo moléculas orgánicas sencillas que asimilan para cubrir sus requerimientos energéticos, creando biomasa microbiana (Capone & Kiene, 1988; Caraco *et al.*, 1989).

El detritus representa una fuente de alimento susceptible de ser utilizada por una gran variedad de consumidores a los que se les denomina detritófagos. Los detritófagos incluyen diversos grupos taxonómicos como protozoarios, artrópodos (crustáceos), moluscos, anélidos, peces y anfibios. Para entender el flujo de energía en la cadena del detritus es importante conocer la importancia de los microorganismos en la nutrición de los detritófagos. Al respecto, se ha observado que las bacterias pueden actuar ya sea como modificadores del detritus, o bien como fuente de alimento. Como agentes modificadores, numerosos estudios han demostrado que la materia orgánica colonizada por los microorganismos es más apetitosa para los detritófagos que aquella que no los tiene, porque éstos cambian la calidad del alimento a partir de su descomposición parcial y lo enriquecen con fósforo y nitrógeno. Por otro lado, debido a que la síntesis del detritus da como resultado la elaboración de biomasa celular bacteriana (producción secundaria), ésta puede ser una fuente de alimento para los detritófagos (Fig. 6).

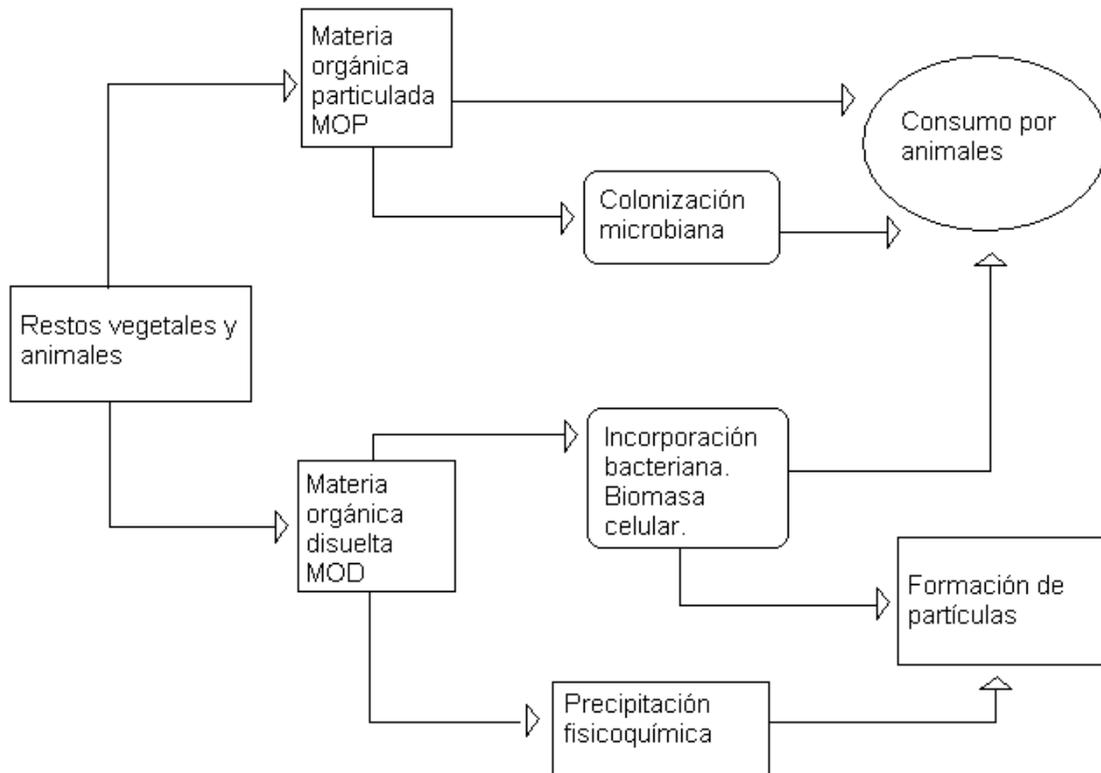


Figura 6. Trama trófica del detritus (Malty, 1994).

Con base en las interacciones que se presentan entre los microbios descomponedores y los animales detritófagos, se pueden distinguir cinco mecanismos potenciales de alimentación en la cadena del detritus (Hildrew, 1994): interacción depredador-presa, competencia microbiota-animales, comensalismo microbiota-animales, interacción comensalismo-depredación y mutualismo

microbiota-animales.

El desarrollo de estas relaciones está determinado por las capacidades digestivas de los detritófagos, las cuales dependen de sus hábitos alimenticios y de su movilidad. Generalmente los organismos con poca capacidad de desplazamiento se especializan en la digestión del material orgánico rico en bacterias, con una capacidad enzimática alta; mientras que los organismos móviles prefieren el material poco colonizado, porque pueden tener acceso a otra clase de alimento por su capacidad para desplazarse.

## **2.9 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA.**

Existen diversos métodos para el estudio de las poblaciones bacterianas en los ecosistemas acuáticos. Estos métodos permiten determinar el número de microorganismos (abundancia), distribución, actividad metabólica y su diversidad a partir del análisis de submuestras representativas de los ecosistemas; los resultados que se obtienen se aplican a la totalidad de la comunidad o del ecosistema. Se debe mencionar que el término representativo significa que la muestra obtenida refleja la diversidad y la densidad de los microorganismos de la totalidad del ambiente del cual se ha extraído. La selección de la técnica que se va a emplear para la caracterización de las poblaciones bacterianas estará en función de los objetivos del estudio, de las propiedades fisicoquímicas del ecosistema y de las características fisiológicas de los microorganismos de interés.

Con cualquiera de los métodos que se vaya a trabajar, un aspecto importante a considerar es el procedimiento de muestreo, éste tiene que asegurar que el número y actividades de los microorganismos no se alteren de manera cuantificable durante la colecta y conservación de la muestra. Además, debe garantizar que la muestra sea representativa y que no esté contaminada con microorganismos extraños provenientes de otros ambientes.

Cuando se va a trabajar con bacterias viables, una vez que la muestra ha sido colectada, ésta se mantiene a baja temperatura para evitar la multiplicación de las bacterias, que altere su número inicial, y se procesa lo más rápido posible. El primer paso en el procesamiento puede involucrar una concentración o una dilución de la muestra, ya que rara vez en el ambiente las bacterias tienen una densidad adecuada para la aplicación de las técnicas. En el sedimento donde hay una gran abundancia bacteriana, se deben efectuar diluciones seriadas de la muestra.

### **Determinación del número de bacterias.**

Primero se tiene que definir el tipo o los tipos de bacterias que se quiere cuantificar, ya que no puede aplicarse un método general para cualquier tipo de microorganismos ya que su diversidad y la de su hábitat requieren enfoques metodológicos diferentes. Existen dos criterios principales para efectuar la cuantificación de las bacterias:

1. Cuantificación directa. Se cuentan las bacterias mediante la observación directa de la muestra al microscopio. Las técnicas de cuantificación directa permiten calcular el número de microorganismos independientemente de su estado fisiológico; sin embargo, tienen dos desventajas principales, no permiten distinguir entre las bacterias muertas de las vivas y los microorganismos observados tampoco pueden ser utilizados para estudios posteriores.

El método más utilizado para el conteo directo es la microscopía de epifluorescencia acoplada al uso de colorantes como el naranja de acridina (AO), el 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el fluorocromo Hoeschst 33258 (bisbenzimidida). Con el naranja de acridina las bacterias con ADN emiten una fluorescencia anaranjada, mientras que las que tienen abundante ARN y proteínas dan una fluorescencia verde; al emplear el DAPI las células bacterianas emiten una intensa fluorescencia azul. La microscopía de epifluorescencia puede usarse para analizar la abundancia del bacterioplancton en los ecosistemas acuáticos (Malty, 1994).

Un segundo método de cuenta directa es la inmunofluorescencia, que trabaja con anticuerpos conjugados con un fluorocromo como el FITC. Se pueden emplear anticuerpos monoclonales para la detección de arqueas metanogénicas.

2. Cuantificación indirecta o recuento de viables. Las técnicas de recuento de viables deben recuperar los microorganismos vivos de las muestras ambientales, mantener su viabilidad y permitir su crecimiento en el laboratorio para que puedan detectarse y contarse. Estas técnicas son selectivas y permiten la cuantificación de poblaciones particulares de bacterias (nitrificantes, sulfatorreductoras, metanogénicas, etc.). Los principales factores que hay que tomar en cuenta en la cuantificación indirecta es la composición del medio de cultivo, las condiciones y el período de incubación. Existen numerosos medios de cultivo para las diferentes especies de bacterias y arqueobacterias, cuya composición debe de ajustarse a los requerimientos nutricionales de cada una. Los medios de cultivo una vez inoculados con la muestra, se incuban a una temperatura específica para cada grupo de bacterias, durante un determinado tiempo para permitir su reproducción y cuantificación. Por último debe mencionarse que cuando se analizan poblaciones bacterianas anaerobias, todo el procesamiento de las muestras debe efectuarse en una atmósfera libre de oxígeno.

Existen básicamente dos métodos de conteo de viables, el método de recuento en placa y el del número más probable (NMP). En la técnica de recuento en placa se trabaja con medios de cultivo que solidifican debido a la presencia de agar. Las colonias que crecen en las placas son contadas y pueden ser diferenciadas con base en su color o propiedades morfológicas. En el método del número más probable (NMP) se trabaja con medios de cultivo líquidos, lo que evita la

necesidad de añadirles el agar como agente solidificante; este método es más laborioso. En la técnica del NMP cada una de las diluciones de la muestra se inoculan en réplicas, generalmente de tres a cinco réplicas por dilución. Éstas se incuban durante un tiempo específico, al término del cual las que presenten crecimiento bacteriano se consideran positivas y en las que no hubo crecimiento de microorganismos son negativas. A partir del número de resultados positivos-negativos y con base en tablas probabilísticas, se calcula el número probable de microorganismos en la muestra (Atlas & Bartha, 2001).

### **Determinación de la actividad bacteriana.**

La cuantificación de la actividad metabólica bacteriana es difícil, ya que la mayoría de los métodos existentes requieren que se manipule el sistema, lo que puede dar como resultado una alteración de las tasas de la actividad microbiana. Entre los métodos para determinar la actividad de los microorganismos está el análisis del potencial heterotrófico, la cuantificación de la productividad y los experimentos con enzimas específicas.

El método de análisis del potencial heterotrófico consiste en agregar a las muestras una concentración conocida de un sustrato susceptible de ser utilizado por las poblaciones bacterianas e incubar las muestras en condiciones semejantes a las del ecosistema durante un tiempo dado, en el cual se estará evaluando el consumo o captación del sustrato por parte de las bacterias presentes en la muestra. Se

establece que la tasa de captación del sustrato se incrementa paulatinamente con el tiempo hasta alcanzar una tasa de captación máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). El cálculo de la  $V_{m\acute{a}x}$  es el valor real de la actividad heterotrófica *in situ* y, como es muy sensible a los cambios ambientales, su cuantificación es útil cuando se quiere comparar las diferencias estacionales o espaciales de la actividad de los microorganismos en el ambiente. En los análisis del potencial heterotrófico se pueden emplear inhibidores para las poblaciones bacterianas que puedan competir con el grupo de interés por el mismo sustrato; también se suelen utilizar sustratos marcados radioactivamente con  $^{14}\text{C}$  y la radioactividad incorporada se mide mediante centelleo de líquidos. La cuantificación de la utilización del sustrato se emplea comúnmente para evaluar la diversidad funcional de las poblaciones bacterianas.

### **Determinación de la composición bacteriana.**

Las especies microbianas tradicionalmente se han cultivado en el laboratorio y han sido identificadas principalmente con base en su morfología, fisiología y metabolismo. Sin embargo, se ha considerado que en la mayoría de los ecosistemas el 99% de los microorganismos aún no ha sido cultivado (Amann *et al.*, 1995). En los últimos años se han dado grandes avances en los estudios de ecología bacteriana con la aplicación de técnicas moleculares que han cambiado la perspectiva de la naturaleza y diversidad de los microorganismos, ya que han permitido estimar entre 300,000 y un millón de especies de bacterias en comparación con las 3,800 que se han descrito a partir de análisis basados en cultivos (Scow *et al.*, 2001). Estas

técnicas permiten detectar poblaciones bacterianas concretas en el ambiente sin necesidad de tener que cultivar los microorganismos en medios específicos, del mismo modo se pueden aplicar para estimar las relaciones filogenéticas de las bacterias y arqueobacterias.

La mayor parte de los estudios que tienen como finalidad el análisis de los cambios temporales y espaciales de las comunidades microbianas se basan en la extracción del ADN de la comunidad total seguido por la amplificación, mediante una PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa) de los genes 16s ARNr. El gen 16s ARNr se emplea para monitorear diferentes clases de microorganismos, ya que tiene la ventaja de ser una molécula altamente conservada que está presente en todos los organismos vivos y es relativamente fácil de aislar (Aravalli *et al.*, 1998). Posterior a la PCR, para comparar rápidamente la diversidad de las secuencias del ADN amplificado, se pueden utilizar técnicas como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica) y DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante) (Scow *et al.*, 2001). Estas técnicas son sumamente útiles en los trabajos de diversidad microbiana; sin embargo, pueden presentarse problemas en cada uno de los pasos (Forney *et al.*, 2004).

Colecta de muestras. Una vez obtenidas las muestras éstas deben ser almacenadas rápidamente para evitar su contaminación y degradación. El crecimiento de

microorganismos contaminantes y la degradación de la muestra por enzimas endógenas y exógenas puede evitarse congelando la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$ , si las muestras van a requerir un largo plazo de almacenamiento preferentemente se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$  o son liofilizadas; con este último procedimiento las muestras pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por períodos prolongados.

Extracción. El aislamiento del ADN genómico es un requerimiento fundamental para los procedimientos con técnicas moleculares. La extracción exitosa del ADN permite llevar a cabo análisis posteriores como PCR, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, ADN Polimórfico Azarosamente Amplificado), secuenciación, etc. Idealmente un buen procedimiento de extracción del ADN debe ser simple, seguro y económico (tanto como sea posible). La utilidad del ADN aislado estará determinado por tres factores (Saunders, 1999):

1. Cantidad o concentración, la cantidad del ADN obtenido debe ser suficiente para llevar a cabo todos los análisis, incluyendo controles y duplicados; asimismo el ADN deberá estar disponible si se requiere hacer un trabajo de concentración.
2. Pureza, el ADN aislado deberá estar libre tanto como sea posible de contaminantes, tanto endógenos como exógenos, que podrían interferir en los subsecuentes análisis.

3. Integridad, un ADN de alto peso molecular (50-200 kpb) se podrá requerir para algunos análisis, mientras que en otros se puede tolerar cierto grado de degradación.

Existen varios procedimientos para la extracción del ADN, su utilización depende de la composición de la muestra, el tiempo y recursos disponibles, así como de los procedimientos analíticos subsiguientes. Un proceso general para la extracción del ADN requiere de los siguientes pasos:

1. Preparación de la muestra. Algunas muestras requieren de una manipulación previa para aumentar el área superficial que estará disponible para la lisis celular. Los pasos previos pueden incluir una homogenización, ya que es esencial que el material seleccionado para el análisis sea representativo de la muestra total. Para cumplir esto las muestras heterogéneas se homogenizan con ayuda de un mortero y un pistilo. Otras técnicas de manipulación pueden incluir una separación diferencial por centrifugación, así como un método para minimizar los efectos de los contaminantes superficiales. Respecto a este punto es importante considerar el uso de guantes durante todos los análisis para evitar que los fluidos corporales o escamas de piel sean introducidas a las muestras y dar falsos resultados.
2. Lisis celular. En este paso se efectúa la rotura de la pared celular o membrana celular y se libera el ADN de la célula o de los organelos. El rompimiento

puede ser químico (usualmente con detergentes), mecánico, enzimático, con microondas, sonicación, calor o congelación.

3. Protección y estabilización del ADN liberado. Generalmente en el proceso de lisis se trabaja con un buffer de extracción que contiene una combinación de reactivos químicos que protegen el ADN de la degradación de nucleasas celulares liberadas durante la lisis.
4. Separación de los ácidos nucleicos de restos celulares o de una matriz ambiental. Se lleva a cabo generalmente con extracciones de fenol-cloroformo.
5. Purificación del ADN. El ARN puede ser eliminado del extracto de ADN por la adición de nucleasas apropiadas. Algunas impurezas que pueden actuar como inhibidores pueden ser eliminadas con columnas de intercambio iónico o con la adición de agentes quelantes.
6. Concentración del ADN. El ADN puede ser concentrado por precipitación con alcohol y con columnas comerciales. Algunos inhibidores se pueden eliminar durante esta fase.

PCR. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las herramientas más utilizadas en biología molecular. Es un método de amplificación exponencial selectiva de un fragmento de ADN mediante su síntesis *in vitro* en un tubo bajo condiciones precisamente establecidas. La técnica contiene siete componentes esenciales:

1. ADN polimerasa termoestable para catalizar la síntesis del ADN molde. Existe una amplia diversidad de enzimas que pueden ser utilizadas, no obstante la elección principal es la *Taq* polimerasa.
2. Un par de oligonucleótidos sintéticos que funcionen como primers (cebadores) para la síntesis del ADN. La correcta selección y diseño de éstos influye en la eficiencia y especificidad de la reacción, lo que permitirá obtener una alta producción de ADN y facilita su subsecuente manipulación.
3. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), una PCR estándar debe contener cantidades equimolares de dATP, dTTP, dCTP y dGTP.
4. Cationes divalentes, todas las ADN polimerasas termoestables requieren de cationes divalentes - usualmente  $Mg^{2+}$  - para su actividad. Debido a que los dNTPs y los oligonucleótidos se enlazan con el  $Mg^{2+}$ , la concentración molar del catión debe exceder la de los grupos fosfato aportados por los dNTPs y los cebadores.
5. Amortiguador, éste mantiene el pH entre 8.3 y 8.8; se utiliza Tris-Cl.
6. ADN molde, el tamaño de éste no es crítico, durante la amplificación suele utilizarse 1 ng de ADN bacteriano (McDowell, 1999).

Electroforesis. La electroforesis, utilizando geles de agarosa o poliacrilamida, se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN con base en su longitud o composición de nucleótidos.

La electroforesis en gel de agarosa emplea el polisacárido agarosa para hacer el gel, éste una vez solidificado se sumerge en un amortiguador y la muestra de ADN se carga en un pozo en uno de los extremos del gel y se aplica una corriente eléctrica. Debido a que el ADN presenta una carga negativa, se moverá hacia el ánodo (polo positivo). Los fragmentos de ADN se irán separando en función de su tamaño, los más pequeños se mueven más rápido, por consiguiente, la migración aumenta conforme el tamaño del fragmento de ADN desciende; sin embargo, esta proporción también depende de la concentración de agarosa, la composición de la solución amortiguadora y de las condiciones de la electroforesis. En general, los geles menos densos se utilizan para separar fragmentos grandes y los más densos se emplean para separar fragmentos pequeños (Hartl & Jones, 2005).

Los fragmentos de ADN forman bandas dentro del gel que se pueden observar cuando éste se tiñe con colorantes fluorescentes como el bromuro de etidio. Este colorante se fija al ADN y es fluorescente al iluminarlo con radiación ultravioleta, permitiendo la visualización de las bandas. Se puede tomar una fotografía del gel (Smith & Wood, 1998).

RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica). Este análisis utiliza enzimas de restricción o endonucleasas, las cuales cortan la molécula de ADN en sitios específicos que son reconocidos por las enzimas. Estas secuencias son específicas para cada enzima y pueden tener una longitud de 4, 6, 8, 10 ó 12 pares de bases. Generalmente, cuanto más pequeña sea la secuencia de reconocimiento,

mayor será el número de fragmentos generados (Ludwig, 2007). La distancia entre los sitios de corte para las enzimas de restricción (sitios de restricción) varía entre individuos debido a inserciones, deleciones o transversiones; lo anterior ocasiona que la longitud de los fragmentos varíe y la posición de ciertos amplicones difiera entre los individuos (polimorfismo). El grado de similitud de los patrones generados por la presencia y ausencia de los fragmentos que resultan de los cambios en los sitios de reconocimiento, se puede utilizar para el análisis comparativo de comunidades microbianas, pudiendo diferenciar especies, poblaciones o inclusive, cepas.

Los fragmentos de restricción resultantes se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida. El gel se puede visualizar con una coloración de bromuro de etidio o mediante una tinción con plata, utilizando un estándar de tamaño molecular conocido para estimar el tamaño del fragmento.

### 3. ANTECEDENTES

De los estudios publicados hasta el momento acerca de la función de la microbiota anaerobia involucrada en las últimas fases de degradación de la materia orgánica se ha establecido que, en los sedimentos anaerobios que reciben un aporte constante de sulfatos, la mineralización del carbono orgánico se efectúa básicamente por medio de las bacterias sulfatorreductoras y en menor proporción por las arqueas metanogénicas (Mountfort *et al.*, 1980; Oremland *et al.*, 1982; Oremland & Polcin, 1982; Senior *et al.*, 1982; Winfrey & Ward, 1983; Fukui *et al.*, 1997; Jickells & Rae, 1997).

La sulfatorreducción representa aproximadamente el 53% de la mineralización total del material orgánico en estos sedimentos y las bacterias sulfatorreductoras pueden competir con las metanogénicas por fuentes comunes de energía. Sin embargo, esta característica puede variar con base en las diferentes condiciones hidrológicas y climáticas que se presentan en los sistemas. A pesar de que la sulfatorreducción es el mecanismo predominante, las arqueas metanogénicas se llegan a presentar en números relativamente altos, dando como resultado la producción de metano en sedimentos enriquecidos con sulfatos (King, 1984); incluso se ha observado que son el principal componente microbiano en sedimentos asociados a manglares (Ramamurthy *et al.*, 1990). Se han aislado diferentes tipos de arqueas metanogénicas en estos sedimentos, pero poco se conoce acerca de su abundancia y de los factores que la determinan. Las arqueas metanogénicas han recibido atención principalmente desde el punto de vista de su bioquímica.

Los estudios existentes sobre biogeoquímica microbiana en ambientes costeros se han llevado a cabo principalmente en ecosistemas acuáticos de latitudes templadas (Winfrey & Ward, 1983; Fukui *et al.*, 1997) y escasamente en ecosistemas de regiones tropicales (Mohanraju & Natarajan, 1992; Mohanraju *et al.*, 1997). Estas investigaciones se han centrado en la cuantificación sólo de alguna de las comunidades microbianas, ya sea sulfatorreductoras o metanogénicas, con dos o tres sustratos y muy pocos estudios han incluido la cuantificación de los dos grupos metabólicos. Otros trabajos han demostrado que el acetato, propionato e hidrógeno son los principales sustratos para la sulfatorreducción (Banat & Nedwell, 1983), mientras que el acetato e hidrógeno son importantes para la metanogénesis (Sørensen *et al.*, 1981; Balba & Nedwell, 1982; King, 1984). Lo anterior determina que las bacterias sulfatorreductoras compitan con las metanogénicas por el hidrógeno y el acetato disponibles, favoreciéndose la sulfatorreducción con altas concentraciones de sulfatos en el ambiente (Abram & Nedwell, 1978).

Los trabajos mencionados anteriormente se han llevado a cabo mediante análisis químicos y microbiológicos, éstos últimos habitualmente basados en cuantificaciones de las bacterias en medios selectivos, pruebas de actividad cinética y aislamientos. En años recientes, los estudios de las comunidades sulfatorreductoras y metanogénicas se han centrado en métodos moleculares que se fundamentan en la detección del 16S ADNr (Olsen *et al.*, 1986; Devereux *et al.*, 1996a; Devereux *et al.*, 1996b). Investigaciones recientes han aplicado las técnicas de biología molecular (específicamente la PCR) para identificar bacterias sulfatorreductoras y

metanogénicas en sedimentos de humedales como marismas, turberas y estuarios (Hales *et al.*, 1996; Munson *et al.*, 1997; Trimmer *et al.*, 1997).

Particularmente en México, las investigaciones microbiológicas realizadas en las zonas estuarinas-lagunares han estado encaminadas básicamente hacia la microbiología de tipo sanitario (Barrera-Escorcia *et al.*, 1990; Rivas & Mendez, 1990) y escasamente hacia la ecología microbiana. Dentro de este campo, los estudios existentes se refieren a las poblaciones de bacterias anaerobias que efectúan el proceso de fotosíntesis (Stolz, 1986 y 1990); la abundancia de las arqueas metanogénicas en sedimentos de la laguna de Términos en Campeche (Pérez-González & Morales-Manilla, 1985) y la distribución y actividad de las bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas en el sedimento del complejo lagunar de Alvarado-Camaronera en Veracruz (Torres-Alvarado, 2001).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Como se menciona anteriormente los estudios acerca de la abundancia y actividad de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas se han llevado a cabo principalmente en zonas costeras de latitudes templadas, donde la temperatura es el factor clave que induce los cambios en los ecosistemas. La mayoría de los trabajos han sido efectuados en sedimentos estuarinos asociados a marismas (*Spartina alterniflora*) (Jones & Paynter, 1980; Winfrey & Ward, 1983; Franklin *et al.*, 1988; Mohanraju & Natarajan, 1992; Fukui *et al.*, 1997; Mohanraju *et al.*, 1997), siendo escasos los trabajos en lagunas costeras templadas caracterizadas por la presencia de pastos marinos (*Ruppia* sp y *Zoostera noltii*) (Schaub & Gemerden, 1996).

Se ha establecido que en los estuarios, caracterizados por la presencia de un gradiente de salinidad desde la zona marina hacia la porción dulceacuícola en la boca del río, existe una separación espacial de los procesos anaeróbicos terminales. A lo largo del gradiente, la degradación de la materia orgánica en las fases terminales anaerobias está dominada por las bacterias sulfatorreductoras en la zona marina con altos contenidos de sulfatos, mientras que en la porción dulceacuícola (con bajos contenidos de sulfatos) prevalece la metanogénesis, por lo que el factor clave que controla la dominancia de los procesos de mineralización es la disponibilidad de sulfatos (Takii & Fukui, 1991; Purdy *et al.*, 2001).

Los trabajos relacionados con los procesos de sulfatorreducción y metanogénesis en latitudes tropicales, donde la precipitación es uno de los factores que contribuye a los

cambios hidrológicos en los ecosistemas, son escasos. Existen algunas investigaciones en sedimentos de lagunas costeras asociadas a manglares (Mohanraju & Natarajan, 1992; Mohanraju *et al.*, 1997), donde se establece que las arqueas metanogénicas que utilizan metanol y metilaminas son el principal componente microbiano en los sedimentos (Ramamurthy *et al.*, 1990).

Asimismo la mayor parte de los estudios se han efectuado en uno o dos sitios o épocas climáticas, lo que limita un entendimiento claro sobre la función de las zonas costeras tropicales en el ciclo y almacenamiento de los elementos (Aller *et al.*, 1996). Lo anterior es particularmente válido en lagunas costeras donde hay una gran acumulación de sedimentos y materia orgánica, particularmente en aquellas que presentan manglares desarrollados y presencia de planicies limosas (Alongi *et al.*, 1999), como es el caso de los complejos lagunares de Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola.

Aunado a la carencia de información global sobre la degradación anaerobia en regiones tropicales, en el caso particular de los ambientes costeros tanto del Golfo como del Pacífico mexicanos los trabajos aún son más escasos. Particularmente en Chiapas, los estudios disponibles son principalmente de tipo hidrológico, biológico y de contaminación. En el caso de los estudios biológicos, éstos se han centrado en el análisis de las comunidades fitoplanctónica, zooplanctónica, nectónica y macrobentónica, no existiendo investigaciones acerca de los microorganismos involucrados en los procesos de mineralización de la materia orgánica y su relación

con los diferentes ciclos biogeoquímicos.

El estudio de las poblaciones bacterianas anaerobias implicadas en las fases terminales del flujo de carbono es particularmente importante en los sistemas de Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola por varias razones. En primer lugar, porque en estos ecosistemas se han evaluado potenciales de óxido-reducción más negativos y contenidos de carbono orgánico superiores en comparación con otras lagunas, en concreto valores de Eh de hasta  $-400$  mV y 7.24% de carbono orgánico (Calva & Torres-Alvarado, 2000). Es de esperarse, por lo tanto, que los principales procesos anaerobios de mineralización de la materia orgánica, sulfatorreducción y metanogénesis en estos ambientes sean importantes.

En segundo lugar, esta región del país está ubicada dentro de una zona de reserva, constituyendo ecosistemas lagunares costeros frágiles y complejos. A la fragilidad y complejidad de estos ecosistemas debe sumarse el significativo vacío de información que caracteriza a esta zona del país, en comparación con otras lagunas costeras mexicanas.

Para poder investigar la mineralización de la materia orgánica en sedimentos anaerobios se requiere un análisis combinado de los parámetros fisicoquímicos con un estudio de la estructura de la comunidad microbiana que incluya métodos microbiológicos tradicionales y moleculares. Esta estrategia permite caracterizar las comunidades microbianas implicadas en los procesos metabólicos de interés.

Con base en lo anterior se planteó el desarrollo del presente trabajo, utilizando técnicas químicas, microbiológicas y moleculares para evaluar la dinámica de las comunidades sulfatorreductora y metanogénica, en diferentes épocas climáticas a lo largo de un ciclo anual, en los sedimentos de los ecosistemas lagunares de Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola que reciben grandes aportes de material orgánico. Lo anterior permitirá determinar cuáles son los cambios que se presentan en la estructura de las comunidades microbianas anaerobias y los parámetros que influyen en ello. Al mismo tiempo, se contribuirá al conocimiento de los procesos de sulfatorreducción y metanogénesis en los ecosistemas costeros de México, considerados ambientes tropicales.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar, en las principales épocas climáticas de la región, es decir, secas y lluvias; la abundancia y actividad de la microbiota anaerobia implicada en las fases terminales de la mineralización de la materia orgánica en dos profundidades del sedimento de los sistemas lagunares Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola en el Estado de Chiapas.

### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Analizar los parámetros físicos y químicos del sedimento a diferentes profundidades y en las dos épocas climáticas en las lagunas sujetas a estudio.
2. Cuantificar, en las temporadas de secas y lluvias, la abundancia de las poblaciones bacterianas sulfatorreductoras a partir de diferentes sustratos, en dos profundidades del sedimento de los sistemas lagunares establecidos.
3. Cuantificar, en las temporadas de secas y lluvias, la abundancia de las poblaciones de arqueas metanogénicas a partir de diferentes sustratos, en dos profundidades del sedimento de los sistemas lagunares establecidos.
4. Evaluar, en las temporadas de secas y lluvias, la competencia entre las bacterias sulfatorreductoras y las arqueas metanogénicas por sustratos

comunes (acetato), en dos profundidades del sedimento de los sistemas lagunares establecidos.

5. Establecer posibles diferencias en la composición microbiana sulfatorreductora y metanogénica.
6. Establecer las posibles relaciones entre dinámica de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica y los parámetros físicos y químicos de los sedimentos.

## **6. HIPÓTESIS**

### **6.1. HIPÓTESIS GENERAL.**

Si la magnitud de las actividades de sulfatorreducción y metanogénesis, implicadas en las fases anaerobias terminales de la mineralización de la materia orgánica en los sedimentos de ambientes costeros, depende de diversas variables ambientales como temperatura, pH, Eh y disponibilidad tanto de donadores como de aceptores de electrones; los cambios en estos parámetros que se presenten en el transcurso de las diferentes épocas climáticas que se suceden a lo largo de un año deberán producir cambios en la abundancia, composición y actividad de la microbiota que participa en la degradación anaerobia de la materia orgánica en las lagunas costeras.

### **6.2. HIPÓTESIS PARTICULARES.**

1. Si hay una correlación directa y positiva entre la temperatura y la actividad sulfatorreductora y metanogénica, es de esperarse que en la temporada de secas (cuando se presenta la máxima insolación y, por consiguiente, un incremento de la temperatura) la actividad de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas aumente.
2. Si los valores de pH próximos a la neutralidad y las condiciones reductoras en el sedimento favorecen el desarrollo de las bacterias sulfatorreductoras y de las arqueas metanogénicas, condiciones muy ácidas o alcalinas, así como la oxidación del sedimento, crearán características desfavorables para la actividad de dichas poblaciones microbianas.

3. Si hay una correlación directa entre el contenido de sulfatos y la actividad sulfatorreductora, y una relación inversa entre este compuesto y la actividad metanogénica, podría esperarse que en la temporada climática donde se presente un descenso de la concentración de sulfatos, la abundancia y actividad de las bacterias sulfatorreductoras disminuirá y la de las arqueas metanogénicas aumentará.
  
4. Si hay una correlación directa entre la cantidad de los sustratos orgánicos y la actividad de bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas, en la temporada de lluvias, cuando aumentan los aportes de materiales orgánicos al ecosistema costero a través de los ríos, se incrementará la actividad de las poblaciones sulfatorreductoras y metanogénicas.

## 7. ÁREA DE ESTUDIO

Los sistemas estuarino-lagunares de Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola son humedales costeros con una elevada diversidad biológica y producción de recursos pesqueros, principalmente camarón y escama. Se localizan en el Estado de Chiapas, en las costas del Pacífico Mexicano, ubicándose dentro de la zona de Reserva de la Biósfera denominada "La Encrucijada". Esta Reserva es una de las regiones de humedales más rica, diversa y productiva de México y recientemente fue incorporada a la Convención sobre Humedales de Importancia Internacional (Ramsar) (INE-SEMARNAP, 1999).

El clima de la región es del tipo Am(w igw", es decir, cálido-húmedo con abundantes lluvias en verano. La precipitación pluvial mínima anual es de 1 300 mm y la máxima de 3, 000 mm. La temporada de lluvias comienza en el mes de mayo y se extiende hasta noviembre, mientras que la sequía abarca los meses de diciembre hasta abril (INE-SEMARNAP, 1999).

Con base en el sistema de clasificación de Lankford (1977), son lagunas costeras pertenecientes a la Región D, tipo III, subtipo A. La región D se encuentra en la costa del Océano Pacífico y comprende desde Mazatlán hasta la frontera con América Central, con 32 lagunas costeras en total.

Tipo III. *Plataforma de barrera interna*. Las lagunas clasificadas en este tipo son depresiones inundadas en los márgenes internos del borde continental, dicho borde

está rodeado por superficies terrígenas en sus márgenes internos y se encuentra protegido del mar por barreras arenosas producidas por corrientes y olas. La antigüedad de la formación de la barrera data del establecimiento del nivel del agua actual, hace aproximadamente 5 mil años. Los ejes de orientación son paralelos a la costa. Son lagunas muy someras, excepto en los canales erosionados (modificados principalmente por procesos litorales como la actividad de huracanes o vientos) y con sedimentación terrígena. Estas lagunas costeras aparecen a lo largo de planicies costeras de bajo relieve, con energía de intermedia a alta.

Subtipo A. Barrera de Gilbert Beaumont. Se presentan barreras arenosas externas, ocasionalmente múltiples, con un escurrimiento ausente o muy localizado. Su forma y batimetría son modificadas por la acción de las mareas, oleajes tormentosos, arena traída por el viento y la presencia de corrientes locales que tienden a segmentar las lagunas. Son de energía relativamente baja, excepto en los canales y durante condiciones de tormenta. Su salinidad es variable, según las condiciones climáticas.

Sistema estuarino-lagunar de Chantuto-Panzacola.

Este sistema se ubica entre los 15° 09' y 15° 17' de latitud norte y los 92° 45' y 92° 55' de longitud oeste, con una extensión de 18 000 Ha. Está conformado por cinco lagunas principales: Chantuto, Campón, Teculapa, Cerritos y Panzacola, una boca de comunicación con el mar, llamada San Juan, y un estuario paralelo a la barrera arenosa denominado El Huetate (Fig. 7). En este ecosistema desembocan tres ríos

con un caudal máximo en el mes de octubre, Cacaluta (144.2 m<sup>3</sup>/s), Cintalapa (66.2 m<sup>3</sup>/s) y Vado Ancho.

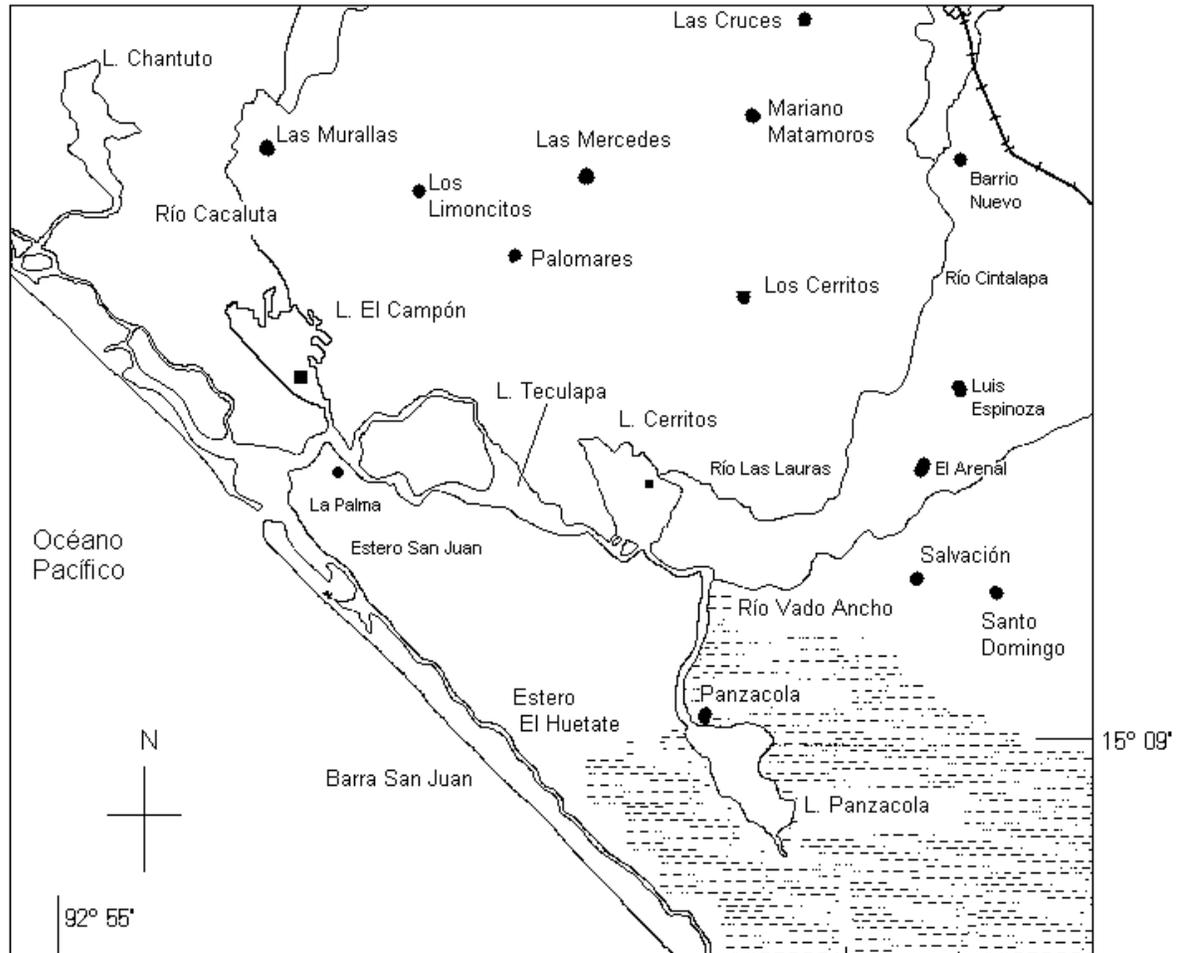


Figura 7. Localización del sistema costero lagunar de Chantuto-Panzacola (Chiapas, México) y estaciones de muestreo.

Este sistema hidrológicamente también refleja la influencia directa de la época climática, presentando un intervalo anual de temperatura entre 29 y 32°C y una salinidad que va de 0 en lluvias hasta 24 en época de secas. Lo anterior origina que el sistema se mantenga durante una parte del ciclo anual como oligohalino y el resto como polihalino. Se caracteriza por tener concentraciones altas de nutrientes, niveles de saturación de oxígeno disuelto y tendencia a la eutroficación, principalmente las lagunas de Chantuto y Cerritos. Con respecto a su productividad, se determinó un intervalo de clorofila a nanofitoplanctónica de 8.37 a 41.2 mg/m<sup>3</sup>; y un intervalo de producción primaria total de 76.4 a 112.0 mg C/m<sup>3</sup>/h (García & Castañeda, 1994).

La vegetación circundante predominante consiste en bosques de manglar, que se desarrollan a lo largo del sistema, siendo de tipo Ribereño y de Cuenca. Está constituido por *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans*, siendo la comunidad más extensa de manglares con una altura promedio de 35 m. Las evaluaciones de biomasa indican que el mayor aporte de hojarasca, proveniente del manglar, se presenta en el otoño (lluvias) con 509.24 g/mes y el menor en primavera (secas), con 362.57 g/mes. De éstos, *Rhizophora mangle* contribuye con casi el 90% del total, relacionándose de modo significativo el mayor aporte con la época de lluvias (Avelino & López, 1992; Avelino *et al.*, 1993). En cuanto a los sistemas acuáticos, se debe destacar que durante la época de lluvias la Laguna de Cerritos es invadida por vegetación dulceacuícola, como *Nymphaea blanda*, *Pistia stratiotes*, *Eichornia crassipes*, *Cabomba* sp., *Salvinia* sp. y *Azolla* sp. (INE-SEMARNAP, 1999).

Con respecto a la comunidad fitoplanctónica, su variación se atribuye a las diferentes condiciones hidrológicas existentes en la zona. En la época de estiaje, con influencia básicamente marina, se presentan los dinoflagelados *Ceratium falcatum*, *C. fusus*, *C. horridum*, *Protoperidinium compressum* y *Dinophysis* sp; así como las diatomeas *Nitzschia marinus*, *Coscinodiscus centralis*, *Thalassiosira exigua* y *Chaetoceros* sp. Por el contrario, en la temporada de lluvias, destaca la presencia en el sistema de especies dulceacuícolas, principalmente cianofíceas (Pérez *et al.*, 1998).

La diversidad y abundancia de la ictiofauna presentan sus máximos valores durante la época de secas. El componente mejor representado corresponde al marino (53 %), seguido del estuarino (40 %) y en menor porcentaje el dulceacuícola (6.7 %). El análisis de distribución, abundancia y frecuencia de las especies mostró la presencia de seis especies dominantes en el sistema: *Caranx hippos*, *Cichlasoma macracanthum*, *Cichlasoma trimaculatum*, *Diapterus peruvianus*, *Gobiomorus maculatus* y *Gobionellus microdon* que representan el 38.2 % en número y el 42.0 % en peso de la captura total (Ortega *et al.*, 1998).

El grupo dominante de la fauna bentónica es Penaeidae (76%), seguido por Amphipoda (12.5%), Luciferidae, (4.5%) y Palaemonidae (3.9%). La distribución estacional de estos grupos es un reflejo de las características climáticas: Penaeidae se presenta en todo el año, mientras que Amphipoda y Palaemonidae son más abundantes en la época lluviosa (Quintero *et al.*, 2000).

### Sistema estuarino-lagunar de Carretas-Pereyra

Se encuentra localizado entre los 15° 23' y 15° 32' de latitud norte y entre los 93° 06' y 93° 15' de longitud oeste, posee una extensión de 3,696 Ha. Está conformado por varios cuerpos acuáticos someros que llevan el nombre de Pereyra, Carretas, Bobo y Buenavista; un cordón estuarino conocido como el Palmarcito. En este complejo lagunar desembocan los ríos Ceniceros, Margaritas y Bobo (Fig. 8).

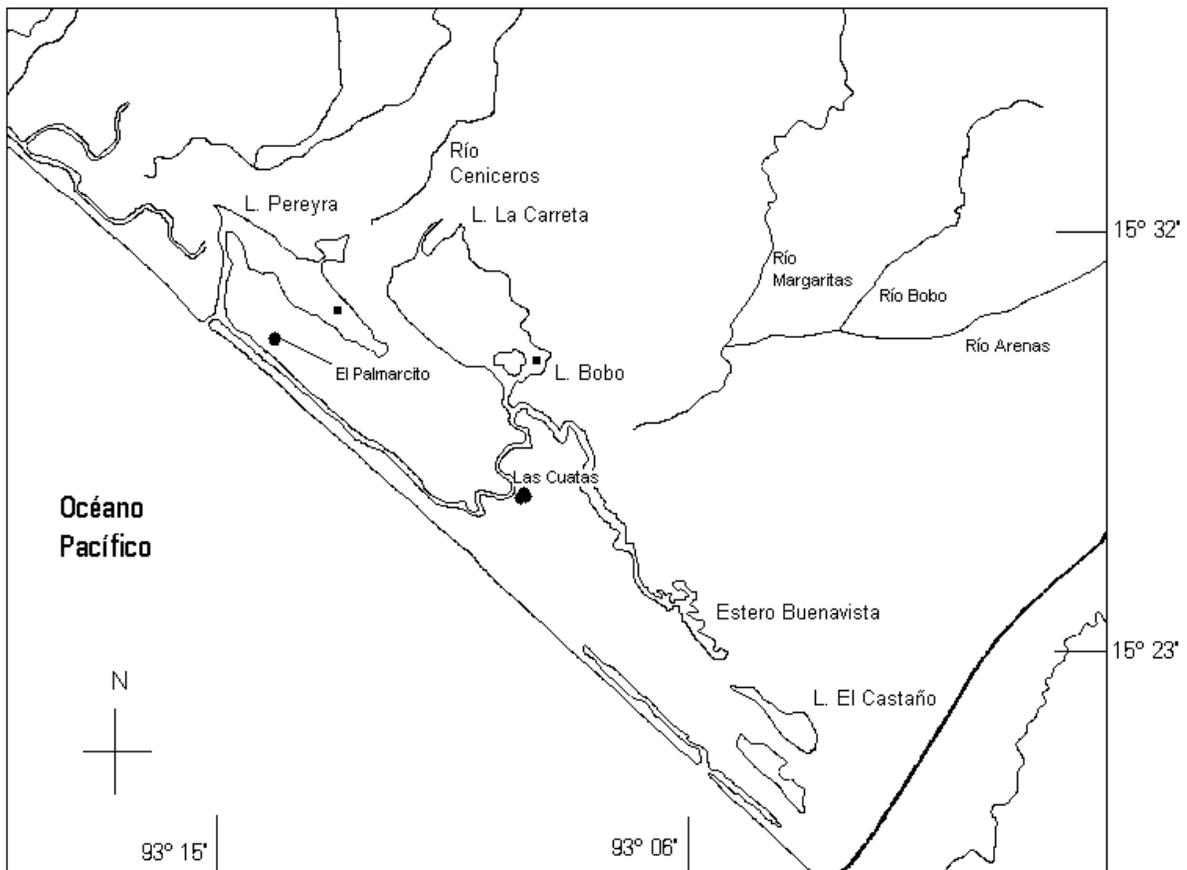


Figura 8. Localización del sistema costero lagunar de Carretas-Pereyra (Chiapas, México) y estaciones de muestreo.

Hidrológicamente, el sistema se caracteriza por manifestar una marcada estacionalidad debido a las épocas climáticas de secas y lluvias. La influencia climática se refleja directamente en los valores promedios anuales de la temperatura, que oscilan entre 29.2 a 32.1°C, y en la salinidad que abarca desde 0 hasta 34.9, al igual que Chantuto-Panzacola, este sistema se mantiene en una parte del ciclo anual como oligohalino y el resto como polihalino (García & Castañeda, 1994). Es un sistema saturado de oxígeno, con niveles altos de nutrientes y una elevada productividad primaria (48.0 a 260.0 mg C/m<sup>3</sup>/hr), así como un intervalo de clorofila a nanofitoplanctónica de 5.9 a 57.8 mg/m<sup>3</sup> (Contreras *et al.*, 1992).

El sistema Carretas-Pereyra presenta tendencia natural a la eutroficación, debido a los aportes significativos de materia orgánica provenientes principalmente de las extensas zonas de manglar y que se acumula principalmente en la fase sedimentaria. La acumulación de materia orgánica, unida a una continua intrusión de larvas de camarón, hace de esta región un área rica que mantiene poblaciones considerables de aves, tanto locales como migratorias. La avifauna acuática influye en la concentración de nutrientes, incrementando los valores del fósforo orgánico hasta en un 69% con respecto al fósforo total (García & Castañeda, 1992).

La vegetación circundante está constituida principalmente por bosques de manglar, y aunque en algunos sitios es notoria la perturbación por actividades agrícolas, mantienen un suministro importante de materia orgánica al ecosistema acuático. Las especies vegetales más representadas son *Rhizophora mangle*, *Laguncularia*

*racemosa* y *Avicennia germinans*, reportándose la presencia de *Rhizophora harrisonii* a partir de este sistema y hacia el sur (Rico-Gray, 1981).

La presencia del fitoplancton es significativa en todo el año, aunque la proporción en abundancia y diversidad está determinada principalmente por las variaciones climáticas. En la época de secas (fase marina) dominan las diatomeas, seguidas por los dinoflagelados. En el grupo de las diatomeas destacan las especies *Striatella unipunctata*, *Amphora proteus*, *Proboscia alata* y *Chaetoceros affinis*; mientras que solo se registra una especie de dinoflagelados, *Peridinium incospicum*. En la temporada de lluvias los organismos dominantes son las cianofíceas, como *Anabaena spiroides* y *Nostoc linckia*, y las clorofitas, de la especie *Haematococcus pluvialis* (Pérez et al., 1999).

El comportamiento del zooplancton es similar al del fitoplancton, es decir, la abundancia y diversidad están determinadas por los cambios hidrológicos propiciados por las épocas de lluvias y estiaje. Durante la temporada de secas, los grupos dominantes son copépodos, decápodos, larvas de cirripedios y pterópodos; mientras que en la de lluvias los cladóceros son dominantes. Éstos, junto con las cianofíceas, son especies indicadoras del proceso de eutroficación (INE-SEMARNAP, 1999).

La ictiofauna en Carretas-Pereyra es principalmente de origen estuarino (50%), seguido por marino (38.9%) y en menor porcentaje dulceacuícola (11%),

registrándose los valores más altos en diversidad y abundancia en la temporada de lluvias. Existen cuatro especies consideradas dominantes: *Gobiomorus microdon*, *Lile stolifera*, *Melaniris guatemalensis* y *Poecilia* sp.; las cuales representan el 79% en número y el 78% en peso de la captura total (Ortega *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que, a pesar de que estos sistemas se localizan en una zona de reserva, se ha detectado contaminación por pesticidas utilizados en las zonas agrícolas aledañas. La concentración media de pesticidas organoclorados para Carretas-Pereyra fue más alta que la concentración que se registró en los sedimentos de Chantuto-Panzacola. Los compuestos predominantes en sedimentos fueron Endosulfan II, Aldrin y Epóxido de Heptacloro; el uso de dichos compuestos está restringido por agencias internacionales para propósitos agrícolas, públicos y de la salud (Rueda *et al.*, 1997).

Asimismo, en el sistema de Chantuto-Panzacola se detecta contaminación de origen fecal por la presencia de bacterias coliformes totales en agua y sedimentos. Los niveles de estas bacterias varían desde no detectables hasta 240,000 células/100 ml, asociándose las mayores cantidades a la temporada de lluvias por los aportes fluviales. Asimismo se han identificado géneros de bacterias patógenas *Shigella* sp., *Salmonella thypi*, *S. parathyphi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. y *Enterobacter aerogenes* (Becerra & Botello, 1995).

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 PROCEDIMIENTO DE CAMPO.

Se colectaron muestras del sedimento bentónico en las lagunas de Cerritos y Campón (Sistema Chantuto-Panzacola), así como en las lagunas Pereyra y Bobo (Sistema Carretas-Pereyra) durante los meses asociados a las temporadas de sequía (junio 2002, febrero y mayo 2003) y lluvias (octubre y noviembre 2002, julio 2003).

La estación de la laguna de Cerritos (15°09'54.4" N, 92°45'34.0" W) se localizó en la desembocadura del Río Cintalapa, próxima a un lecho de *Thypha latifolia*. En estudios anteriores se determinó en esta zona sedimento de tipo arenoso con un contenido de carbono orgánico del 0.7-5.6%. La estación de la laguna Campón (15°12'30.0" N, 92°51'24.2" W) presentó un sedimento limo-arenoso, con un contenido de carbono orgánico de 2.8-21.7%.

En la laguna de Pereyra (15°31'26.1" N, 92°51'24.2" W) el sedimento fue limo-arenoso, esta laguna recibe al aporte del Río Margaritas. La laguna de Bobo (15°29'22.0" N, 93°08'44.6" W) se caracterizó por un sedimento limo-arcilloso.

En cada estación se colectaron muestras de sedimento con un nucleador constituido por un tubo de acrílico de 4.5 cm de diámetro y 45 cm de longitud, el cual se introdujo hasta una profundidad de 20 cm dentro del sedimento. En cinco profundidades del sedimento (3, 6, 9, 12 y 15 cm) se cuantificó *in situ* la temperatura con un termómetro

(-10 a 60°C), el potencial de óxido-reducción (Eh) y la concentración del ión hidrógeno (pH) con electrodos Instrulab, registrándose las lecturas en un loanalizador marca Orion Research modelo 399A. Para el potencial redox se utilizó un electrodo de platino y un electrodo de referencia de calomel saturado, con un potencial de referencia de +198 mV adicionado al valor medido. Durante el trabajo de campo ambos electrodos se estandarizaron rutinariamente con solución ZoBell (3 mM de ferrocianuro de potasio y 0.1 M de cloruro de potasio) (Langmuir, 1971). Posteriormente las muestras se transportaron al laboratorio a baja temperatura (4°C), para efectuar los análisis bacteriológicos y de las variables fisicoquímicas. Las muestras para los análisis bacteriológicos se procesaron inmediatamente, mientras que las determinaciones de las variables fisicoquímicas se efectuaron en un plazo no mayor de 15 días.

## **8.2 PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO.**

### **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

Bajo una atmósfera de nitrógeno, los núcleos de cada estación se fraccionaron en dos estratos de sedimento, 0-6 cm y 6-12 cm de profundidad. Cada uno de los estratos se homogenizó en una bolsa de plástico con agitación constante y se dividieron en tres submuestras. Una submuestra del sedimento homogenizado se utilizó para la cuantificación de las poblaciones bacterianas sulfatorreductoras y metanogénicas, así como para la evaluación de la actividad cinética. El resto de la misma se congeló (-20°C) para el análisis de la composición bacteriana.

La segunda submuestra se fijó con acetato de zinc al 20% para fijar los sulfatos presentes (Alongi *et al.*, 1999) y se conservó a baja temperatura para evaluar el contenido de éstos. La tercera submuestra, sin fijar, se congeló hasta realizar los análisis de las demás variables fisicoquímicas (Fig. 9).

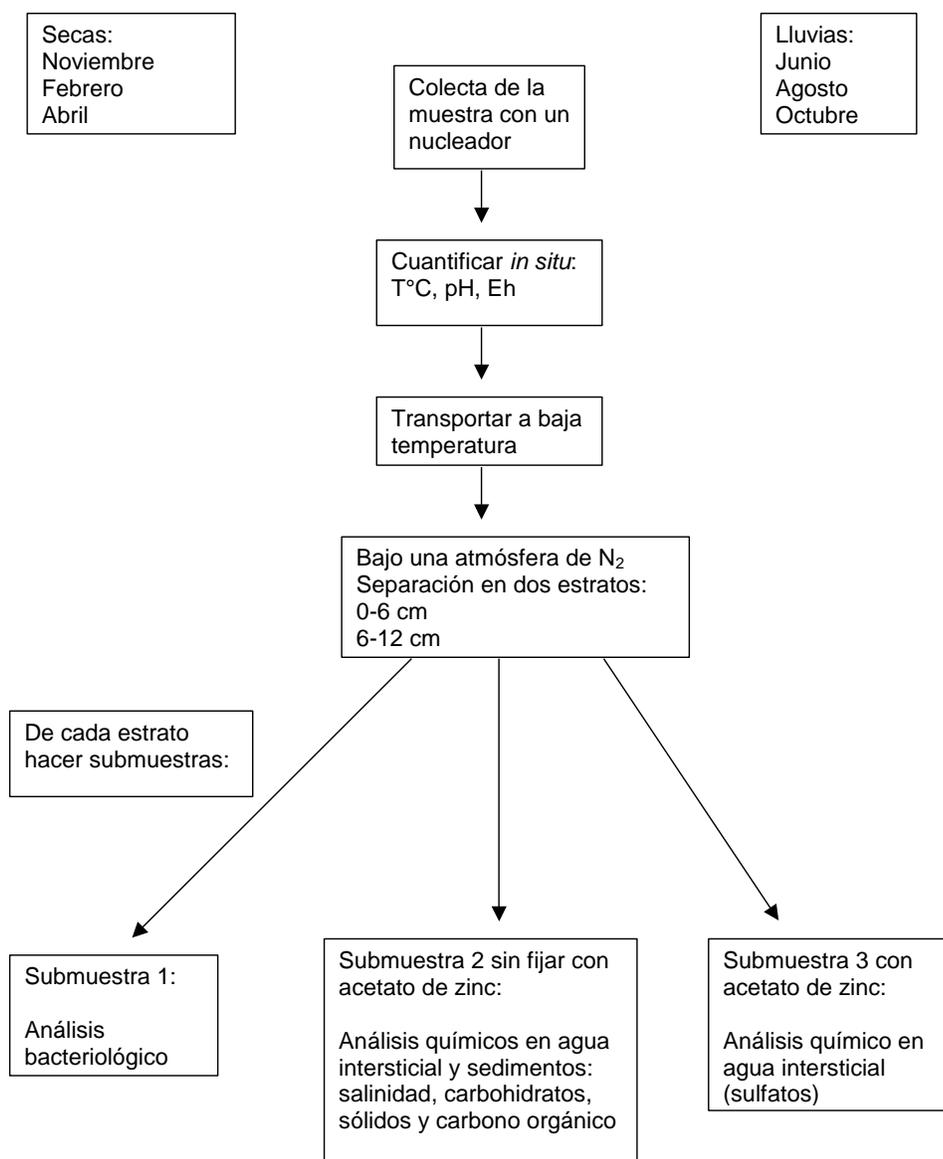


Figura 9. Diagrama de flujo donde se muestra la colecta y preparación de las muestras.

## **ANÁLISIS DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS**

Las muestras de sedimento sin fijar, así como las conservadas con acetato de zinc al 20%, se centrifugaron a 3,600 rpm a baja temperatura (4-5°C) durante 20 minutos, para separar el agua intersticial del sedimento (Howes, 1985). El agua intersticial se filtró a través de membranas Millipore® de 0.45 µm. En el agua intersticial de las muestras no conservadas, la salinidad se determinó por medio de un refractómetro marca American Optical y los carbohidratos disueltos totales se analizaron por la técnica de Dubois *et al.* (1956) y Strickland y Parsons (1972). En el agua intersticial de las muestras con acetato de zinc se determinó el contenido de sulfatos con el método de Howarth (1978).

En el sedimento húmedo (sin centrifugar) se llevó a cabo la evaluación del contenido de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) siguiendo las recomendaciones de APHA (1989). Una fracción aproximada de 2 g de sedimento se dejó secar a temperatura ambiente para determinar el contenido de carbono orgánico, de acuerdo con el método de Gaudette *et al.* (1974).

## **ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO**

### **1. Cuantificación de las poblaciones bacterianas.**

La cuantificación de las bacterias sulfatorreductoras y de las arqueas metanogénicas se llevó a cabo mediante la técnica del número más probable (NMP), efectuando diluciones en serie de cada muestra ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) y con cuatro tubos por dilución. El análisis de las BSR abarcó la cuantificación con cuatro sustratos: lactato, acetato,  $H_2$ -

CO<sub>2</sub> y propionato, utilizándose el medio de Ravot *et al.* (1995). Para la microbiota metanogénica se llevaron a cabo cuantificaciones con acetato, H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> y metanol. Se empleó el medio básico de Balch *et al.* (1979).

Los medios se redujeron mediante ebullición bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> para desplazar el oxígeno y se distribuyeron en tubos de cultivo con tapón de neopreno y rosca (Hungate, 1969), se purgaron durante 30 segundos con una mezcla N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%) y se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos. Subsecuentemente, la salinidad y el pH del medio se ajustaron con soluciones de NaCl (330 g/l) y bicarbonato (10%), respectivamente, hasta obtener la salinidad y el pH determinados en el sedimento en cada muestreo. Posteriormente para disminuir el Eh del medio de cultivo se agregó NaS-9 H<sub>2</sub>O al 2.5%. En el caso de los tubos para el cultivo de las BSR, se adicionó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para una concentración final de 20 mM. Finalmente se agregaron los sustratos, a partir de soluciones concentradas 1 M, para obtener una concentración final de 20 mM. Todas las soluciones fueron previamente reducidas y esterilizadas.

Los tubos para el análisis de las BSR se incubaron a 32°C durante 14 días, contándose como positivos los que presentaron formación de ácido sulfhídrico, detectado colorimetricamente con un espectrofotómetro Spectronic 20D+ siguiendo la técnica de Cord-Rowisch (1985). Los tubos para el análisis de las arqueas metanogénicas se incubaron a 32°C durante un mes, al término del cual se evaluaron como positivos los que presentaron producción de metano, detectado con un

cromatógrafo de gases GOW-MAC equipado con un detector de conductividad y una columna empacada Carbosphere 80/100. Las temperaturas de operación fueron de 140°C, 190°C y 170°C para la columna, detector e inyector, respectivamente.

## **2. Pruebas de actividad cinética.**

Se utilizó el medio básico de Balch *et al.* (1979) para los experimentos de actividad cinética a partir de acetato.

Competencia por acetato. Los experimentos de mineralización se efectuaron en botellas de suero de 100 ml de capacidad. El medio preparado se redujo mediante ebullición, bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>, para desplazar el oxígeno, posteriormente se distribuyeron 32 ml en cada una de las botellas de suero y se sellaron con tapón de neopreno y rosca metálica; éstas se purgaron durante un minuto con una mezcla N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%) y se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos. Subsecuentemente, la salinidad y el pH del medio se ajustaron con soluciones de NaCl (330 g/l) y bicarbonato (10%), respectivamente, hasta obtener la salinidad y el pH determinados en el sedimento de cada laguna por cada uno de los muestreos. Posteriormente se agregó NaS-9 H<sub>2</sub>O al 25% para disminuir el Eh del medio de cultivo. Finalmente se agregó acetato como sustrato, a una concentración final de 20 mM, tanto en presencia como en ausencia de sulfatos 20 mM. Las botellas se inocularon con 8 ml de sedimento húmedo y se incubaron en la oscuridad a 35°C durante 30 días. Es importante mencionar que cada experimento se hizo por duplicado para cada una de las muestras obtenidas y se trabajó con los controles

respectivos (sin sustrato), con y sin sulfatos en el medio.

La mineralización se evaluó midiendo las concentraciones de acetato de las botellas durante 30 días, con intervalos de 24 horas. Los cambios en la concentración de acetato se midieron con un cromatógrafo de gases Agilent Serie 6890 Plus equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar Agilent Crosslinked FFAP de 15 m x 0.530 mm x 1.00 µm. La temperatura del inyector fue de 100°C, la del horno de 40°C y la del detector de 100°C .

### **3. Análisis moleculares.**

a) Propagación de cepas microbianas. Con la finalidad de tener muestras que pudieran ser utilizadas como controles durante los análisis moleculares, se llevo a cabo la propagación de las cepas de *Desulfovibrio* y *Methanosarcina mazei* en medios de cultivo específicos para las BSR y AM, respectivamente.

b) Extracción de los ácidos nucleicos. La extracción de los ácidos nucleicos se efectuó únicamente en las muestras correspondientes a los meses de mayo y octubre, utilizándose el Kit Ultra Clean Soil DNA (MoBio, Solana Beach, Calif.) con 1.5 g del sedimento húmedo y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN en los cultivos de propagación de *Desulfovibrio* y *Methanosarcina mazei* se extrajo con el Kit de Purificación de ADN Wizard® Genomic (Promega).

El resultado de la extracción de los ácidos nucleicos se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1x utilizando 5 µl del extracto. Se empleó un tiempo de corrida de 1 h a 90 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio, visualizándose en un Fotodocumentador EpiChemi<sup>3</sup>Darkroom de UVP Bioimaging Systems. Las bandas obtenidas se compararon con el patrón de la ADN ladder 1Kb (Promega), el cual presenta fragmentos de 250 a 10 000 pares de bases.

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los genes 16S ADNr fueron amplificados selectivamente, mediante PCR, a partir del ADN extraído del sedimento y de los cultivos de propagación. Los primers para la PCR fueron modificaciones de los reportados en los trabajos de Amann *et al.* (1992) y Ficker *et al.* (1999). En el caso de las BSR se utilizó el primer forward SRB-385FM (5'-ATGGAATTCCCTGACGCAGC5ACGCCG-3') y el primer reverso UNIV-907RM (5'-GTAGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG-3'). Para las AM se trabajó con el primer forward AR-21FM (5'-GCGAATTCTTCCGGTTGATCC(CT)GCCGG-3') y el mismo primer reverso empleado para las BSR. Los primers fueron sintetizados por BQ The Providers.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 50 µl de agua desionizada estéril: PCR buffer 1x (10x) [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 5 µl; MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM (50mM), 2.5 µl; mezcla de dNTPs (Invitrogen) (10mM), 1 µl; primer forward, 10 pmol; primer reverso, 10 pmol; Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen) (5 U),

0.5 µl; ADN extraído, 1 µl. Es importante mencionar que en la mayoría de los casos se trabajó con diluciones (1/10) de la muestra de ADN extraído; asimismo la concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizada en las PCR se estableció a partir de pruebas con un gradiente de 2 a 4 mM.

Se utilizó un termociclador Thermo PXE02. Los ciclos de temperatura (30 en total) para la PCR de las bacterias sulfatorreductoras fueron 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación a 65°C y 1 min de extensión a 72°C; al terminar los 30 ciclos se dejaron 10 min de extensión final a 72°C. En el caso de las arqueas metanogénicas también se llevaron a cabo 30 ciclos: 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación a 45°C y 1 min de extensión a 72°C; al terminar los 30 ciclos se dejaron 10 min de extensión final a 72°C. La temperatura de hibridación para los primers de las BSR se fijó a partir de pruebas con un gradiente de 65 a 75°C, establecido con base en la T<sub>m</sub> de los cebadores. En el caso de los primers de las AM las temperaturas fueron las recomendadas en el trabajo de Ficker *et al.* (1999).

El resultado de la PCR para ambos grupos microbianos se revisó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1x con 5 µl de muestra. Se empleó un tiempo de corrida de 1 hr 30 min a 90 volts. Posteriormente el producto de la PCR fue purificado con el Kit de Purificación QIAquick de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El resultado de la purificación (aproximadamente 50 µl de producto purificado) también fue comprobado con una electroforesis en un gel de

agarosa al 1.5% con buffer TAE 1x, con un tiempo de corrida de 1 h 30 min a 90 volts y también con 5 µl de muestra. En ambos casos los geles se tiñeron con bromuro de etidio, visualizándose en el Fotodocumentador. Las bandas obtenidas se compararon con el patrón de la ADN ladder 1Kb (Promega), el cual presenta fragmentos de 250 a 10 000 pares de bases.

c) Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP).

Se buscaron secuencias del gen 16S ADNr, tanto para las BSR como para las AM en la base de datos Gen Bank. Las secuencias reportadas se alinearon con el programa NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y su longitud se ajustó a la posición de los primers forward y reverso utilizados en la PCR de cada grupo microbiano. Posteriormente para cada secuencia obtenida, con el programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) se buscaron las enzimas de restricción, seleccionándose aquellas secuencias de reconocimiento y corte de 4 pb.

La mezcla de reacción para el RFLP contenía en un volumen final de 30 µl de agua desionizada estéril: NE buffer 1x (10x), 1 µl; ADN amplificado y purificado, 20 µl; enzima, 5 U. Las enzimas de restricción empleadas para las BSR fueron *Bfal* y *HaeIII*, mientras que para las AM se utilizó *AluI* y *RsaI*. Paralelamente a las muestras, se trabajó con controles positivos: ADN del bacteriófago λ ( 125 y 250 ng) y el producto obtenido de la PCR de las cepas de *Desulfovibrio* y *Methanozarcina mazeii*. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 h 30 min.

Se tomaron 20  $\mu$ l del producto de la digestión para ser analizado por medio de una electroforesis con un gel de agarosa al 2.5% en buffer TAE 1x, con un tiempo de corrida de 3 h a 90 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio, visualizándose en el Fotodocumentador. El tamaño de las bandas obtenidas se compararon con el patrón de la ADN ladder 100 pb (Promega), el cual presenta fragmentos de 100 a 1 500 pares de bases.

Las técnicas detalladas y la preparación de los medios de cultivo se encuentran descritas en el Anexo Metodológico.

### **8.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.**

La variabilidad estacional y temporal de los parámetros fisicoquímicos, así como de las abundancias y actividad microbianas, se analizó por medio de las comparaciones de los valores centrales (media, mediana), dependiendo de si había o no homoscedasticidad. En el caso de varianzas desiguales se aplicó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis; si las varianzas fueron semejantes, se utilizó un análisis de varianza de una vía. En ambos casos se emplearon como factores el espacio (distribución vertical) y el tiempo (mes y época climática) para determinar si existían diferencias significativas (Zar, 1999). Para determinar la relación entre la dinámica de las bacterias sulfatorreductoras y de las arqueas metanogénicas con las condiciones fisicoquímicas del sedimento, se efectuó un análisis de correlación de Spearman. Se utilizó el programa estadístico NCSS (2007).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LAGUNAS.

Sistema Chantuto-Panzacola. La laguna de Cerritos tuvo una profundidad media de 1.1 m en la temporada de secas y de 1.3 m en los meses de lluvias. En esta laguna desemboca el río Cintalapa, con un flujo variable que depende de la época climática, el mayor flujo se presentó en octubre ( $66.2 \text{ m}^3/\text{seg}$ ) y el menor en mayo ( $0.4 \text{ m}^3/\text{seg}$ ) debido a diferencias estacionales en la precipitación. La laguna fue colonizada durante la temporada de lluvias por abundante lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y nenúfares (*Nymphaea blanda*). En la laguna de Campón, en la época de secas se registró una profundidad media de 0.8 m, mientras que en la temporada de lluvias fue de 0.9 m. En esta laguna desemboca el río Cacaluta, con un flujo máximo también en el mes de octubre ( $144.2 \text{ m}^3/\text{seg}$ ) y un mínimo en mayo ( $0.5 \text{ m}^3/\text{seg}$ ).

Sistema Carretas-Pereyra. La laguna de Pereyra tuvo una profundidad media de 1.0 m en la temporada de secas y de 0.7 m en los meses de lluvias. Esta laguna es una zona de crianza y alimentación para diversas especies de aves migratorias. En la laguna Pereyra desemboca el Río Margaritas, del cual no se tienen datos de su volumen de descarga. En la laguna de Bobo la profundidad media fue de 0.7 m y de 0.5 m para la temporada de secas y lluvias, respectivamente. A partir del mes de diciembre del año 2002 en esta laguna se realizaron actividades de dragado.

## **9.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.**

### **Mediciones *in situ***

En las tablas 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos de las evaluaciones de temperatura, pH y Eh a diferentes profundidades de sedimento en las lagunas estudiadas, durante las diferentes épocas climáticas.

**Tabla 2. Distribución vertical de la temperatura, pH y Eh en la columna sedimentaria del sistema lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).**

Mes	Cerritos				Campón		
	Profundidad cm	Temperatura °C	pH	Eh mV	Temperatura °C	pH	Eh mV
Febrero 2003	3	28.5	7.0	46	29.5	7	20
	6	28.2	7.0	-292	29.1	7.2	-226
	9	28.2	7.0	-320	29.1	7.1	-320
	12	28.2	7.2	-340	28.7	7	-426
	15	28	7.0	-350	28.7	6.9	-450
Mayo 2003	3	31	7.2	20	30.5	7.2	20
	6	30.3	7.2	-199	30.1	7.1	-126
	9	30	7.2	-230	29	7.1	-210
	12	29.5	7.2	-344	29	7	-340
	15	29.5	7.0	-340	29	7	-350
Junio 2002	3	28	7.0	40	30	7.2	-110
	6	27.7	7.0	-111	29.8	7.2	-284
	9	27.7	6.9	-230	29.5	7.1	-350
	12	25.7	6.9	-336	28.4	6.9	-355
	15	25.5	6.9	-350	28	6.9	-426
Julio 2003	3	28.5	7.0	110	29.5	6.9	110
	6	28.3	6.9	50	29.1	6.7	100
	9	27.5	6.9	-210	28.5	6.7	-110
	12	27.5	6.9	-326	28.4	6.7	-253
	15	27	6.9	-326	28	6.6	-350
Octubre 2002	3	28	6.9	140	30	6.6	110
	6	27.7	6.9	111	29.8	6.5	102
	9	26	6.9	-110	29.5	6.5	-120
	12	25.7	6.9	-226	28.4	6.7	-236
	15	25.5	6.8	-330	28	6.6	-350
Noviembre 2002	3	25.5	6.9	40	29	6.7	40
	6	25.5	6.9	-102	28.4	6.5	-102
	9	25	6.9	-220	26	6.7	-230
	12	25	6.9	-340	25.7	6.7	-336
	15	25	6.8	-350	25.5	6.5	-426

**Tabla 3. Distribución vertical de la temperatura, pH y Eh en la columna sedimentaria del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México).**

Mes	Profundidad	Pereyra			Carretas		
		Temperatura	pH	Eh	Temperatura	pH	Eh
Febrero 2003	cm	°C		mV	°C		mV
	3	28.5	7.0	-110	29.5	7.1	-210
	6	28.2	6.9	-360	29.1	6.9	-385
	9	27.5	6.9	-426	29.0	6.9	-390
	12	27.5	6.9	-490	28.7	6.9	-411
	15	27.5	6.9	-490	28.5	7.0	-450
Mayo 2003							
	3	31.0	7.0	-120	31.0	7.1	-110
	6	30.3	6.9	-360	30.1	7.1	-213
	9	30.0	7.1	-426	30.0	6.9	-310
	12	29.5	6.9	-490	29.0	6.7	-370
	15	29.5	6.9	-490	29.0	6.7	-426
Junio 2002							
	3	29.0	6.9	-110	30.0	7.0	-90
	6	28.7	6.7	-190	29.8	6.9	-270
	9	28.0	6.7	-230	29.0	6.9	-270
	12	27.7	6.7	-380	28.4	6.9	-328
	15	27.5	6.7	-426	28.0	6.8	-350
Julio 2003							
	3	30.0	6.9	100	31.0	6.8	100
	6	30.0	6.8	-155	30.0	6.8	-111
	9	29.5	6.7	-330	29.0	6.7	-250
	12	29.5	6.6	-437	29.0	6.6	-311
	15	29.0	6.6	-450	29.0	6.6	-350
Octubre 2002							
	3	29.0	6.9	90	29.0	6.9	40
	6	28.7	6.7	-110	28.8	6.9	-125
	9	28.0	6.7	-255	28.5	6.8	-150
	12	27.7	6.7	-330	28.4	6.8	-213
	15	27.5	6.7	-410	28.0	6.8	-330
Noviembre 2002							
	3	27.5	6.8	20	28.5	6.9	30
	6	27.0	6.7	-110	28.4	6.9	-225
	9	27.0	6.7	-350	28.0	6.8	-310
	12	27.0	6.7	-490	25.7	6.8	-413
	15	26.5	6.6	-490	25.5	6.7	-426

A partir de estos datos se determinó durante la época de secas un promedio de temperatura en el sedimento del sistema Chantuto-Panzacola de 28.8°C, mientras que en Carretas-Pereyra fue de 29.0°C, siendo febrero el mes más frío y mayo el más cálido. En la temporada de lluvias, el promedio fue de 27.4°C para Chantuto-Panzacola y 28.4°C en Carretas-Pereyra. Las variaciones no fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 4). Espacialmente, la temperatura fue superior en los primeros centímetros del sedimento y descendió al aumentar la profundidad, tanto en secas como en lluvias, para ambos sistemas; aunque las variaciones verticales no fueron tampoco significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 5).

**Tabla 4. Análisis de varianza para determinar diferencias temporales entre las variables fisicoquímicas en los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.**

Variable	Sistema lagunar Chantuto-Panzacola				Sistema lagunar Carretas-Pereyra			
	Secas	Lluvias	$p$	$r$	Secas	Lluvias	$p$	$r$
Temperatura (°C)	28.70	27.40	0.35	0.14	28.91	28.43	0.33	0.15
pH	7.07	6.76	0.00*	1.00	7.01	6.75	0.00*	1.00
Eh (mV)	-281	-125	0.02*	1.00	-353	-229	0.03*	1.00
Salinidad	19.16	2.66	0.00*	0.99	24.58	5.41	0.00*	0.88
Sulfatos (mM)	10.45	3.32	0.00*	0.69	12.36	2.70	0.00*	0.58
Sólidos totales (g/L)	391.80	312.14	0.14	0.30	245.60	199.99	0.35	0.14
Sólidos volátiles (g/L)	45.00	101.95	0.00*	0.82	88.33	36.98	0.03*	0.56
Porosidad	0.36	0.43	0.16	0.28	0.23	0.42	0.00*	0.99
Carbono orgánico (g/L)	32.07	90.11	0.01*	0.74	75.62	108.15	0.24	0.2
Carbohidratos (g/L)	0.05	0.06	0.60	0.08	0.04	0.06	0.18	0.02

\*, diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 5. Análisis de varianza para determinar diferencias espaciales entre las variables fisicoquímicas en los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.**

<b>Sistema lagunar Chantuto-Panzacola</b>								
Variable	Secas				Lluvias			
	Media		<i>p</i>	<i>r</i>	Media		<i>p</i>	<i>r</i>
	0-6 cm	6-12 cm			0-6 cm	6-12 cm		
Temperatura (°C)	29.20	28.25	0.2	0.23	28.13	26.78	0.14	0.29
pH	7.11	7.03	0.25	0.19	6.70	6.80	0.48	0.10
Eh (mV)	-206	-356	0.00*	0.97	36	-286	0.00*	0.99
Salinidad	21.33	17.00	0.17	0.25	2.50	2.80	0.84	0.05
Sulfatos (mM)	11.08	9.81	0.19	0.24	3.78	2.86	0.22	0.21
Sólidos totales (g/L)	445.5	338.11	0.09	0.37	320.79	303.49	0.84	0.05
Sólidos volátiles (g/L)	42.61	47.39	0.77	0.05	105.58	98.33	0.84	0.05
Porosidad	0.33	0.39	0.34	0.14	0.43	0.43	0.98	0.05
Carbono orgánico (g/L)	29.81	34.32	0.68	0.06	86.24	93.99	0.86	0.05
Carbohidratos (g/L)	0.05	0.06	0.68	0.06	0.05	0.06	0.63	0.07

<b>Sistema lagunar Carretas-Pereyra</b>								
Variable	Secas				Lluvias			
	Media		<i>p</i>	<i>r</i>	Media		<i>p</i>	<i>r</i>
	0-6 cm	6-12 cm			0-6 cm	6-12 cm		
Temperatura (°C)	29.36	28.46	0.08	0.42	28.53	28.33	0.82	0.05
pH	6.9	6.8	0.8	0.05	6.80	6.70	0.08	0.41
Eh (mV)	-296	-411	0.02*	0.66	-106	-353	0.00*	0.94
Salinidad	27.33	21.83	0.11	0.34	6.00	4.80	0.71	0.06
Sulfatos (mM)	13.01	11.71	0.12	0.33	3.48	1.93	0.14	0.3
Sólidos totales (g/L)	261.71	229.49	0.68	0.06	211.57	188.41	0.72	0.06
Sólidos volátiles (g/L)	75.22	101.43	0.57	0.08	28.40	45.57	0.27	0.17
Porosidad	0.23	0.22	0.81	0.05	0.40	0.45	0.38	0.12
Carbono orgánico (g/L)	71.23	145.07	0.14	0.3	60.93	90.31	0.23	0.20
Carbohidratos (g/L)	0.07	0.06	0.64	0.07	0.04	0.05	0.36	0.13

\*, diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Con respecto al pH, se registraron diferencias significativas entre las épocas climáticas ( $p < 0.05$ , Tabla 4). En los meses asociados a la temporada de secas las condiciones promedio de pH fueron neutras y alcalinas, tanto para Chantuto-Panzacola (7.1), como en Carretas-Pereyra (7.0). En los meses de lluvias se evaluaron características ácidas en ambos sistemas lagunares, con un promedio de 6.8. A nivel espacial, como en el caso de la temperatura, el pH fue relativamente constante a lo largo de los 15 cm de profundidad en los estratos sedimentarios en los

dos sistemas, observándose una tendencia a la disminución del pH cuando aumenta la profundidad del sedimento, con excepción de las lagunas de Chantuto-Panzacola en la temporada de lluvias. No obstante las variaciones registradas, éstas no fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 5).

Los potenciales de óxido-reducción (Eh) a nivel temporal fueron más reductores en la estación de secas, con promedios de  $-242$  mV y  $-323$  mV en los sistemas de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, respectivamente; en comparación con la presencia de las lluvias, donde las condiciones en el sedimento fueron más reductoras con un promedio de  $-138$  mV en Chantuto-Panzacola y de  $-225$  mV en Carretas-Pereyra. Las diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 4). Al contrario que con la temperatura y el pH, se determinó un descenso significativo del Eh en relación con la profundidad de la columna sedimentaria en ambas épocas climáticas, tanto en Chantuto-Panzacola como en Carretas-Pereyra ( $p < 0.05$ , Tabla 5).

#### **Mediciones en el laboratorio.**

Como se indicó en la metodología, la salinidad, el contenido de sulfatos, de sólidos totales, sólidos volátiles, carbono orgánico y carbohidratos, se evaluaron sólo en dos estratos de la columna sedimentaria (0-6 cm y de 6-12 cm), los mismos donde se efectuaron también los análisis microbiológicos. En las Tablas 6 y 7 se presentan los resultados de las variables fisicoquímicas mencionadas.

**Tabla 6. Variables fisicoquímicas evaluadas durante las épocas de secas y lluvias en los sedimentos del complejo lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México) en el periodo 2002-2003**

		<b>Laguna Cerritos</b>					
		Época de lluvias			Época de secas		
Variable	Profundidad cm	Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
Temperatura (°C)	0-6	27.5	27.7	25.0	28.2	29.5	27.7
	6-12	28.3	25.7	25.5	28.2	30.3	25.7
Salinidad del agua intersticial	0-6	2	0	0	14	24	5
	6-12	2	0	0	10	20	8
Sulfatos (mM)	0-6	4.7	2.1	4.6	12.5	10.5	9.9
	6-12	2.7	2.1	2.9	11.2	9.2	9.6
pH	0-6	6.9	6.9	6.9	7.0	7.2	7.0
	6-12	6.9	6.9	6.9	7.2	7.2	6.9
Eh (mV)	0-6	109	111	-102	-292	-199	-111
	6-12	-326	-226	-340	-340	-344	-336
Sólidos totales (g/L)	0-6	225.86	225.49	616.24	510.96	437.77	596.32
	6-12	251.56	574.06	318.06	348.81	434.04	398.25
Sólidos volátiles (g/L)	0-6	54.53	202.04	96.10	25.00	42.51	45.88
	6-12	24.05	106.53	42.02	16.43	25.23	33.55
Porosidad del sedimento (g/cm <sup>3</sup> )	0-6	0.42	0.48	0.23	0.27	0.30	0.30
	6-12	0.43	0.33	0.15	0.42	0.28	0.44
Carbono orgánico (g/L)	0-6	56.8	110.10	69.22	46.55	17.65	35.80
	6-12	49.13	51.90	10.80	17.25	10.41	29.61
Carbohidratos (g/L)	0-6	0.06	0.06	0.03	0.02	0.12	0.04
	6-12	0.04	0.11	0.11	0.04	0.12	0.05

		<b>Laguna Campón</b>					
Variable	Profundidad cm	Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
Temperatura (°C)	0-6	29.1	29.8	28.4	29.1	30.1	29.8
	6-12	28.4	28.4	25.7	28.7	29	28.4
Salinidad del agua intersticial (ups)	0-6	5	2	6	30	24	21
	6-12	8	2	5	20	20	14
Sulfatos (mM)	0-6	4.7	1.7	4.9	11.2	13.8	8.6
	6-12	3.9	1.7	3.9	8.9	11.5	8.5
pH	0-6	6.7	6.5	6.5	7.2	7.1	7.2
	6-12	6.7	6.7	6.7	7	7	6.9
Eh (mV)	0-6	100	102	-102	-226	-126	-284
	6-12	-253	-236	-336	-426	-340	-355
Sólidos totales (g/L)	0-6	349.36	218.25	289.55	520.16	306.55	301.26
	6-12	340.38	159.45	177.46	313.19	205.24	329.16
Sólidos volátiles (g/L)	0-6	72.19	64.55	144.09	79.77	25.00	37.50
	6-12	152.36	67.58	197.46	113.24	55.02	40.92
Porosidad del sedimento (g/cm <sup>3</sup> )	0-6	0.47	0.58	0.43	0.30	0.32	0.54
	6-12	0.52	0.63	0.54	0.32	0.49	0.39
Carbono orgánico (g/L)	0-6	34.53	48.7	198.09	43.09	28.21	7.6
	6-12	47.49	186.7	217.95	69.22	50.95	28.5
Carbohidratos (g/L)	0-6	0.04	0.06	0.05	0.02	0.10	0.04
	6-12	0.03	0.03	0.03	0.02	0.11	0.06

**Tabla 7. Variables fisicoquímicas evaluadas durante las épocas de secas y lluvias en los sedimentos del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México) en el período 2002-2003**

<b>Laguna Pereyra</b>							
Variable	Profundidad cm	Época de lluvias			Época de secas		
		Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
Temperatura (°C)	0-6	30	28.7	27	28.2	30.3	28.7
	6-12	29.5	27.7	27	27.5	29.5	27.7
Salinidad del agua intersticial (ups)	0-6	10	0	8	28	36	22
	6-12	10	0	5	24	30	22
Sulfatos (mM)	0-6	4.8	1.9	2.2	13.7	14.3	11.3
	6-12	3.2	0.4	1.3	11.3	14.3	11.3
pH	0-6	6.8	6.7	6.7	6.9	6.9	6.7
	6-12	6.6	6.7	6.7	6.9	7.0	6.7
Eh (mV)	0-6	-155	90	-110	-360	-360	-190
	6-12	-437	-255	-490	-490	-490	-380
Sólidos totales (g/L)	0-6	223.48	316.74	143.64	182.62	260.91	295.61
	6-12	304.90	186.58	56.58	247.98	192.30	60.21
Sólidos volátiles (g/L)	0-6	24.278	47.29	25.60	30.21	42.86	52.70
	6-12	24.738	53.09	25.61	153.16	43.78	60.21
Porosidad del sedimento (g/cm <sup>3</sup> )	0-6	0.53	0.46	0.31	0.30	0.29	0.15
	6-12	0.58	0.53	0.36	0.33	0.31	0.21
Carbono orgánico (g/L)	0-6	30.74	74.61	88.51	109.09	52.69	61.49
	6-12	91.52	122.26	169.81	125.90	277.63	284.09
Carbohidratos (g/L)	0-6	0.03	0.05	0.04	0.02	0.12	0.04
	6-12	0.04	0.04	0.12	0.04	0.11	0.03

<b>Laguna Bobo</b>							
Temperatura (°C)	0-6	31	28.8	25.7	29.1	30.1	29.8
	6-12	29	28.4	28.4	28.7	29	28.4
Salinidad del agua intersticial (ups)	0-6	14	0	4	30	26	22
	6-12	12	0	2	12	22	21
Sulfatos (mM)	0-6	6.4	1.3	4.3	14.3	13.2	11.3
	6-12	3.9	1.3	1.5	11.3	11.3	10.8
pH	0-6	6.8	6.9	6.9	6.9	7.1	6.9
	6-12	6.6	6.8	6.8	6.9	6.9	6.9
Eh (mV)	0-6	-111	125	-225	-385	-213	-270
	6-12	-311	-213	-413	-411	-370	-328
Sólidos totales (g/L)	0-6	87.5	394.06	104.00	125.73	509.77	195.62
	6-12	105.53	285.63	191.24	200.08	471.04	205.35
Sólidos volátiles (g/L)	0-6	17.93	40.69	14.65	39.47	248.63	37.50
	6-12	19.45	39.39	111.15	79.77	220.78	50.92
Porosidad del sedimento (g/cm <sup>3</sup> )	0-6	0.38	0.30	0.42	0.27	0.26	0.15
	6-12	0.31	0.49	0.43	0.30	0.02	0.17
Carbono orgánico (g/L)	0-6	29.49	84.51	57.73	74.72	38.42	91.00
	6-12	30.74	78.04	49.51	52.25	33.00	97.57
Carbohidratos (g/L)	0-6	0.04	0.06	0.02	0.08	0.10	0.06
	6-12	0.04	0.07	0.02	0.04	0.10	0.04

Con base en los resultados, se obtuvieron diferencias significativas de la salinidad del agua intersticial ( $\rho < 0.05$ , Tabla 4) a nivel temporal, en la época de secas se registró un promedio de 19.2 en el sistema Chantuto-Panzacola; mientras que en Carretas-Pereyra fue de 24.5. Durante los meses de lluvias, en Chantuto-Panzacola se registró un promedio de salinidad de 8.0 y en Carretas-Pereyra de 5.4. Es importante mencionar que en ambos sistemas durante el mes de octubre las condiciones fueron totalmente dulceacuícolas (0.0) como resultado de la precipitación y un incremento del aporte proveniente de los ríos. Con respecto a la distribución de la salinidad en relación con la profundidad, en ambos sistemas lagunares, tanto en secas como en lluvias, se observó una disminución de la salinidad del agua intersticial al incrementarse la profundidad del sedimento; sin embargo, estos cambios no fueron significativos ( $\rho < 0.05$ , Tabla 5).

En las lagunas de los sistemas costeros estudiados las concentraciones máximas de sulfatos se presentaron en los meses de la temporada de secas, tanto en el sistema Chantuto-Panzacola (10.5 mM promedio) como en Carretas-Pereyra (12.4 mM promedio); mientras que los promedios mínimos se evaluaron en la estación de lluvias, con 3.3 mM en Chantuto-Panzacola y 2.7 mM en Carretas-Pereyra. Las diferencias, como en el caso de la salinidad, fueron significativas ( $\rho < 0.05$ , Tabla 4). Espacialmente, se determinó el mismo comportamiento en el caso de los sulfatos que con la salinidad, es decir, que las máximas concentraciones se cuantificaron en

el estrato superior sedimentario de ambos sistemas en las dos épocas climáticas estudiadas; aunque los cambios tampoco fueron significativos ( $\rho < 0.05$ , Tabla 5).

El comportamiento estacional del contenido de los sólidos totales fue similar en ambos sistemas. Aparentemente hubo un incremento en los meses de secas tanto en las lagunas de Chantuto-Panzacola (391.81 g/L) como de Carretas-Pereyra (245.60 g/L), y una disminución en los meses de lluvias, con promedios de 312.14 g/L y 199.99 g/L en las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, respectivamente. No obstante lo anterior, los cambios no fueron significativos ( $\rho < 0.05$ , Tabla 4). En lo que respecta a la distribución vertical, se cuantificó un mayor contenido de sólidos totales en los 6 cm superiores del sedimento en comparación con el estrato inferior. Este patrón se presentó en ambos sistemas y en las dos épocas climáticas, no obstante los cambios no fueron significativos ( $\rho < 0.05$ , Tabla 5).

Se presentaron variaciones temporales significativas de la cantidad de sólidos volátiles en ambos sistemas ( $\rho < 0.05$ , Tabla 4). Sin embargo, la máxima concentración promedio en las lagunas de Chantuto-Panzacola se determinó en los meses de lluvias, con 101.96 g/L, y el mínimo en secas con 45 g/L. Por el contrario, en Carretas-Pereyra el máximo (88.33 g/L) se cuantificó en secas y el mínimo en lluvias (33.99 g/L). En relación a su comportamiento por estratos en el sistema Carretas-Pereyra, en ambas épocas climáticas la concentración se incrementó en

relación directa con la profundidad. El mismo patrón se observó en Chantuto-Panzacola sólo en los meses de secas. Los cambios verticales no fueron significativos ( $p < 0.05$ , Tabla 5).

A partir de los resultados obtenidos del análisis de los componentes orgánicos del sedimento, se determinó en el sistema Chantuto-Panzacola un contenido de carbono orgánico menor en los meses de secas (32.07 g/L) y mayor en los meses con lluvias (101.96 g/L); las diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 4). Por el contrario, en las lagunas de Carretas-Pereyra el promedio de carbono orgánico aumentó de 75.62 g/L en secas a 108.15 g/L en lluvias; dichas variaciones no fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 4). Espacialmente, el carbono orgánico tuvo una tendencia a incrementarse conforme aumentó la profundidad de la columna del sedimento en los dos sistemas lagunares, tanto en la temporada de secas como de lluvias; no obstante los cambios no fueron significativos ( $p < 0.05$ , Tabla 5). Es importante mencionar que en las lagunas de Pereyra y Campón la cantidad de carbono orgánico se incrementó en el estrato de 6-12 cm. En estas lagunas a dicha profundidad se observó la presencia de una gran cantidad de restos de madera de los árboles que fueron arrastrados por los ríos a las lagunas durante la tormenta tropical "Javier" en el año de 1998, así como restos de organismos fitoplanctónicos (Fig.10).



A.



B.

Figura 10. Restos de organismos fitoplanctónicos identificados en el estrato sedimentario de los 6-12 cm de profundidad en las lagunas de Campón y Pereyra (Chiapas, México). A = *Coscinodiscus*; B = *Nitzschia*.

Por lo que se refiere a los carbohidratos totales en el agua intersticial, en ambos sistemas se determinó la mayor cantidad en la temporada de lluvias, con un promedio de 60 mg/L en Chantuto-Panzacola y de 70 mg/L en Carretas-Pereyra. En la época de secas el promedio fue de 50 mg/L, en los dos casos, aunque estas variaciones no fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 4). En relación a la distribución vertical, ésta fue semejante a la observada para los sólidos volátiles y el carbono orgánico, con excepción de que en la temporada de secas en las lagunas de Carretas-Pereyra, la mayor concentración se evaluó a menor profundidad (6 cm). Las diferencias espaciales no fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 5).

### **9.3. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA**

A lo largo de las diferentes meses y profundidades analizados, correspondientes a las dos épocas climáticas, se registraron variaciones en el número de las poblaciones microbianas anaerobias sulfatorreductoras y metanogénicas.

#### **Bacterias sulfatorreductoras.**

En las Tablas 8 y 9 se presentan los resultados de las cuantificaciones de las bacterias sulfatorreductoras (BSR), para cada uno de los sustratos analizados en los sedimentos lagunares. Con base en estos datos se determinó que el intervalo general de la abundancia de la microbiota sulfatorreductora fue de  $10^5$ - $10^{10}$  células/g ST, tanto para las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola como de Carretas-Pereyra.

**Tabla 8. Abundancia de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica durante las épocas de secas y lluvias en los sedimentos del sistema lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México) en el período 2002-2003**

<b>Laguna Cerritos</b>							
Grupo nutricional	Profundidad cm	Época de lluvias			Época de secas		
		Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
BSR-lactato (cel/g ST)	0-6	2.66E+07	2.24E+08	5.84E+08	7.83E+09	1.60E+10	2.20E+10
	6-12	1.59E+08	6.67E+07	1.89E+08	5.45E+09	1.65E+10	1.00E+10
BSR-propionato (cel/g ST)	0-6	1.77E+05	7.09E+05	6.49E+05	2.60E+09	1.40E+09	1.20E+09
	6-12	1.03E+05	2.34E+05	1.89E+05	1.38E+09	1.40E+09	1.15E+09
BSR-acetato (cel/g ST)	0-6	4.87E+07	4.67E+07	4.70E+07	1.83E+09	1.17E+09	1.37E+09
	6-12	1.03E+07	2.24E+07	4.54E+07	1.22E+09	1.76E+09	1.21E+09
BSR-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	8.41E+06	1.27E+06	6.49E+06	2.76E+08	2.01E+08	1.37E+08
	6-12	2.39E+06	1.00E+06	2.20E+06	2.01E+08	1.34E+08	1.15E+08
AM-acetato (cel/g ST)	0-6	1.00E+07	5.34E+07	1.26E+07	1.72E+05	5.99E+05	1.51E+05
	6-12	5.70E+07	4.48E+07	4.22E+07	7.83E+05	9.14E+05	4.77E+05
AM-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	3.86E+07	1.00E+07	1.07E+07	7.83E+04	2.74E+04	1.02E+05
	6-12	3.52E+07	5.22E+07	1.30E+07	8.03E+04	5.30E+04	1.03E+05
AM-metanol (cel/g ST)	0-6	1.51E+08	1.00E+08	3.73E+07	6.46E+06	4.38E+06	1.02E+06
	6-12	3.52E+08	3.36E+08	1.89E+08	7.56E+06	7.54E+06	1.15E+06

<b>Laguna Campón</b>							
Grupo nutricional	Profundidad cm	Época de lluvias			Época de secas		
		Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
BSR-lactato (cel/g ST)	0-6	1.72E+08	1.17E+08	1.26E+08	2.24E+10	2.20E+10	2.24E+10
	6-12	1.18E+08	1.76E+07	1.62E+08	1.69E+10	2.20E+10	7.69E+09
BSR-propionato (cel/g ST)	0-6	1.14E+06	6.72E+05	2.78E+06	2.92E+09	1.40E+09	1.92E+09
	6-12	7.64E+05	1.76E+05	2.03E+06	2.61E+09	1.20E+09	1.20E+09
BSR-acetato (cel/g ST)	0-6	3.15E+06	9.19E+06	4.16E+06	2.92E+09	1.20E+09	1.40E+09
	6-12	3.08E+06	3.08E+06	1.20E+06	1.40E+09	6.99E+09	1.40E+09
BSR-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	5.44E+06	1.77E+06	2.78E+06	1.61E+08	1.50E+08	2.24E+08
	6-12	1.76E+06	9.69E+05	2.03E+06	1.04E+08	1.20E+08	1.15E+08
AM-acetato (cel/g ST)	0-6	1.90E+07	1.41E+07	1.53E+07	6.54E+04	2.44E+04	2.00E+05
	6-12	1.03E+07	1.41E+07	1.11E+07	1.09E+05	2.28E+04	5.44E+05
AM-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	8.51E+06	1.13E+07	1.32E+07	8.30E+04	1.61E+05	2.06E+04
	6-12	1.90E+07	3.08E+07	2.22E+07	1.15E+05	2.28E+05	9.45E+05
AM-metanol (cel/g ST)	0-6	2.28E+08	1.03E+08	1.32E+08	7.55E+06	9.26E+06	1.90E+06
	6-12	3.04E+08	3.50E+08	1.90E+08	8.51E+06	1.08E+06	2.00E+06

BSR= bacterias sulfatorreductoras  
 AM= arqueas metanogénicas  
 cel/g ST= células/gramo de sólidos totales

**Tabla 9. Abundancia de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica durante las épocas de secas y lluvias en los sedimentos del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México) en el período 2002-2003**

<b>Laguna Pereyra</b>							
		Época de lluvias			Época de secas		
Grupo nutricional	Profundidad cm	Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
BSR-lactato (cel/g ST)	0-6	8.53E+07	5.05E+07	4.60E+07	2.30E+09	1.08E+09	2.19E+10
	6-12	1.52E+07	1.77E+07	2.78E+07	9.88E+08	4.06E+08	2.42E+10
BSR-propionato (cel/g ST)	0-6	1.52E+06	1.89E+06	4.87E+06	2.33E+09	3.38E+09	1.53E+09
	6-12	8.53E+06	1.82E+06	1.06E+05	9.88E+08	9.90E+08	1.29E+09
BSR-acetato (cel/g ST)	0-6	1.25E+06	1.71E+06	5.66E+06	2.68E+09	2.03E+09	1.76E+09
	6-12	1.12E+06	1.70E+06	4.87E+06	2.08E+09	9.34E+09	1.29E+09
BSR-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	1.48E+06	5.05E+06	7.07E+06	3.64E+08	2.95E+08	3.29E+08
	6-12	1.12E+06	3.61E+06	4.18E+06	1.53E+08	2.03E+08	1.13E+08
AM-acetato (cel/g ST)	0-6	2.95E+07	1.26E+07	1.06E+07	6.57E+05	1.26E+05	2.71E+05
	6-12	2.71E+07	2.14E+07	1.32E+07	4.84E+05	1.72E+05	2.95E+05
AM-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	3.44E+07	1.01E+07	5.57E+07	2.74E+05	1.53E+05	3.94E+05
	6-12	3.72E+07	1.23E+07	6.01E+07	2.42E+06	1.66E+05	5.37E+05
AM-metanol (cel/g ST)	0-6	2.08E+07	1.79E+07	1.26E+07	2.37E+06	3.38E+06	1.89E+06
	6-12	2.68E+07	1.31E+07	2.02E+07	5.83E+06	3.93E+06	3.75E+06

<b>Laguna Bobo</b>							
		Época de lluvias			Época de secas		
Grupo nutricional	Profundidad cm	Julio 2003	Octubre 2002	Noviembre 2002	Febrero 2003	Mayo 2003	Junio 2002
BSR-lactato (cel/g ST)	0-6	6.63E+07	2.79E+07	5.77E+08	4.51E+08	1.64E+09	4.77E+09
	6-12	3.77E+07	1.40E+07	1.15E+08	1.27E+08	2.43E+08	3.50E+09
BSR-propionato (cel/g ST)	0-6	6.86E+06	4.82E+05	1.83E+06	2.90E+09	3.07E+09	2.23E+09
	6-12	3.13E+06	1.40E+05	1.15E+05	9.90E+08	9.90E+08	2.00E+09
BSR-acetato (cel/g ST)	0-6	3.20E+06	5.08E+06	3.85E+06	5.94E+08	1.64E+09	2.55E+09
	6-12	3.03E+06	4.03E+06	3.14E+06	7.00E+08	9.30E+08	9.30E+08
BSR-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	5.69E+06	4.82E+06	1.78E+06	1.20E+08	5.62E+08	3.18E+08
	6-12	3.89E+06	2.10E+06	1.35E+06	1.27E+08	5.62E+07	2.00E+08
AM-acetato (cel/g ST)	0-6	1.95E+07	1.20E+07	1.54E+07	2.07E+04	8.49E+04	8.00E+04
	6-12	3.07E+07	3.50E+07	2.39E+07	2.00E+04	3.73E+04	3.13E+05
AM-hidrógeno (cel/g ST)	0-6	1.02E+07	8.12E+07	1.12E+07	1.15E+04	1.49E+04	4.57E+04
	6-12	6.82E+07	5.77E+07	1.75E+07	1.83E+04	3.73E+04	7.58E+04
AM-metanol (cel/g ST)	0-6	1.36E+08	3.50E+07	3.27E+07	1.83E+05	1.37E+05	1.04E+06
	6-12	3.07E+08	8.12E+07	3.04E+07	2.50E+05	1.49E+05	5.71E+06

BSR= bacterias sulfatorreductoras  
 AM= arqueas metanogénicas  
 cel/g ST= células/gramo de sólidos totales

La abundancia de la microbiota sulfatorreductora tuvo cambios temporales significativos ( $p < 0.05$ , Tabla 10). Las BSR fueron más abundantes en los meses representativos de la temporada de secas; por el contrario, en los meses asociados con la temporada de lluvias su abundancia disminuyó.

**Tabla 10. Análisis de ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) para determinar diferencias temporales entre las abundancias de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica en los sistemas lagunares Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.**

Microbiota células/g ST	Sistema lagunar Chantuto-Panzacola				Sistema lagunar Carretas-Pereyra			
	Secas	Lluvias	$p$	$r$	Secas	Lluvias	$p$	$r$
	Mediana				Mediana			
BSR-L	$1.6 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^8$	0.00*	1.00	$1.36 \times 10^9$	$4.18 \times 10^7$	0.05*	0.50
BSR-P	$1.4 \times 10^9$	$6.6 \times 10^5$	0.00*	1.00	$1.76 \times 10^9$	$1.82 \times 10^6$	0.00*	1.00
BSR-A	$1.3 \times 10^9$	$9.7 \times 10^6$	0.00*	1.00	$1.46 \times 10^9$	$3.17 \times 10^6$	0.00*	1.00
BSR-H	$1.4 \times 10^8$	$2.1 \times 10^6$	0.00*	1.00	$1.76 \times 10^8$	$3.75 \times 10^6$	0.00*	0.99
AM-A	$1.9 \times 10^5$	$1.47 \times 10^7$	0.00*	0.99	$1.49 \times 10^5$	$2.04 \times 10^7$	0.00*	1.00
AM-H	$9.2 \times 10^4$	$1.61 \times 10^7$	0.00*	0.99	$1.14 \times 10^5$	$3.58 \times 10^7$	0.00*	0.99
AM-M	$5.4 \times 10^6$	$1.89 \times 10^8$	0.00*	0.99	$2.13 \times 10^6$	$2.86 \times 10^7$	0.02*	0.62

\*, diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

BSR-L = lactato; BSR-P = propionato; BSR-A = acetato; BSR-H = hidrógeno

AM-A = acetato; AM-H = hidrógeno; AM-M = metanol

Aunado a las variaciones estacionales del número de las BSR, también se observaron cambios de abundancia por sustrato. Al respecto, en las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola en la temporada de secas la densidad sulfatorreductora fue: lactato ( $1.6 \times 10^{10}$  cel/g ST) > propionato ( $1.4 \times 10^9$  cel/g ST) > acetato ( $1.3 \times 10^9$  cel/g ST) > hidrógeno ( $1.4 \times 10^8$  cel/g ST). En el período de lluvias las BSR-L siguieron siendo las más abundantes ( $1.5 \times 10^8$  cel/g ST), seguidas por las BSR que emplean

acetato ( $9.7 \times 10^6$  cel/g ST); sin embargo, el grupo nutricional que utiliza propionato ( $6.6 \times 10^5$  cel/g ST) fue desplazado por las BSR-H ( $2.1 \times 10^6$  cel/g ST).

En las lagunas del sistema Carretas-Pereyra también se registró una alternancia por el sustrato. En los meses relacionados con secas se determinó el siguiente orden decreciente: lactato ( $1.36 \times 10^9$  cel/g ST) > propionato ( $1.76 \times 10^9$  cel/g ST) > acetato ( $1.46 \times 10^9$  cel/g ST) > hidrógeno ( $1.76 \times 10^8$  cel/g ST). En los meses de lluvias el orden fue: lactato ( $4.2 \times 10^7$  cel/g ST) > hidrógeno ( $3.75 \times 10^6$  cel/g ST) > acetato ( $1.82 \times 10^6$  cel/g ST) > propionato ( $3.17 \times 10^6$  cel/g ST).

En lo que respecta a la distribución vertical de las BSR, éstas mostraron una tendencia a ser más abundantes en los primeros 6 cm del sedimento y disminuyeron al aumentar la profundidad; sin embargo, en la mayoría de los casos las diferencias espaciales no fueron significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 11). Las excepciones a lo anterior se presentaron en la época de secas con las cuantificaciones a partir de propionato en el sistema Carretas-Pereyra y con hidrógeno en Chantuto-Panzacola ( $p < 0.05$ , Tabla 11).

**Tabla 11. Análisis de ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) para determinar diferencias espaciales entre las abundancias de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica en los sistemas lagunares Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.**

Sistema lagunar Chantuto-Panzacola								
Microbiota células/g ST	Secas				Lluvias			
	Mediana		<i>p</i>	<i>r</i>	Mediana		<i>p</i>	<i>r</i>
0-6 cm	6-12 cm	0-6 cm			6-12 cm			
BSR-L	2.2x10 <sup>10</sup>	1.32x10 <sup>10</sup>	0.14	0.3	1.49x10 <sup>8</sup>	9.23x10 <sup>7</sup>	0.21	0.22
BSR-P	1.66x10 <sup>9</sup>	1.29x10 <sup>9</sup>	0.28	0.17	6.9x10 <sup>5</sup>	2.11x10 <sup>5</sup>	0.38	0.13
BSR-A	1.38x10 <sup>9</sup>	1.31x10 <sup>9</sup>	0.25	0.19	2.80x10 <sup>7</sup>	6.69x10 <sup>6</sup>	0.32	0.15
BSR-H	1.81x10 <sup>8</sup>	1.17x10 <sup>8</sup>	0.04*	0.55	4.11x10 <sup>6</sup>	1.89x10 <sup>6</sup>	0.05	0.51
AM-A	1.61x10 <sup>5</sup>	5.1x10 <sup>5</sup>	0.13	0.31	1.47x10 <sup>7</sup>	2.81x10 <sup>7</sup>	0.27	0.18
AM-H	8.06x10 <sup>4</sup>	1.09x10 <sup>5</sup>	0.24	0.2	1.1x10 <sup>7</sup>	2.65x10 <sup>7</sup>	0.1	0.37
AM-M	5.42x10 <sup>6</sup>	4.77x10 <sup>6</sup>	0.82	0.05	1.17x10 <sup>8</sup>	3.2x10 <sup>8</sup>	0.00*	0.94

Sistema lagunar Carretas-Pereyra								
Microbiota células/g ST	Secas				Lluvias			
	Mediana		<i>p</i>	<i>r</i>	Mediana		<i>p</i>	<i>r</i>
0-6 cm	6-12 cm	0-6 cm			6-12 cm			
BSR-L	1.97x10 <sup>9</sup>	6.97x10 <sup>8</sup>	0.93	0.05	5.84x10 <sup>7</sup>	2.25x10 <sup>7</sup>	0.26	0.18
BSR-P	2.6x10 <sup>9</sup>	9.9x10 <sup>8</sup>	0.00*	0.96	1.86x10 <sup>6</sup>	9.8x10 <sup>5</sup>	0.72	0.06
BSR-A	1.89x10 <sup>9</sup>	9.32x10 <sup>8</sup>	0.07	0.43	3.52x10 <sup>6</sup>	3.08x10 <sup>6</sup>	0.61	0.07
BSR-H	3.06x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>	0.09	0.38	4.93x10 <sup>6</sup>	2.85x10 <sup>6</sup>	0.16	0.27
AM-A	1.28x10 <sup>5</sup>	1.61x10 <sup>5</sup>	0.98	0.05	1.4x10 <sup>7</sup>	2.55x10 <sup>7</sup>	0.06	0.45
AM-H	9.93x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	0.77	0.05	2.28x10 <sup>7</sup>	4.74x10 <sup>7</sup>	0.59	0.7
AM-M	1.46x10 <sup>6</sup>	3.84x10 <sup>6</sup>	0.15	0.28	2.67x10 <sup>7</sup>	2.86x10 <sup>7</sup>	0.47	0.19

\*, diferencias significativas (*p* < 0.05)

BSR-L = lactato; BSR-P = propionato; BSR-A = acetato; BSR-H = hidrógeno

AM-A = acetato; AM-H = hidrógeno; AM-M = metanol

### Arqueas metanogénicas.

La abundancia de las arqueas metanogénicas (AM) para cada uno de los sustratos analizados en los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, se presenta en las Tablas 8 y 9. A partir de estas tablas se estableció que el intervalo general de la densidad de la microbiota metanogénica fue de 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> células/g ST para los dos sistemas lagunares.

A nivel temporal, como en el caso de la microbiota sulfatorreductora, se determinaron variaciones en la abundancia de las AM; pero al contrario de las BSR, las AM fueron más abundantes durante los meses asociados a las lluvias. Las variaciones estacionales fueron significativas con los tres sustratos utilizados ( $p < 0.05$ , Tabla 10).

A diferencia de las BSR, en las lagunas del sistema de Chantuto-Panzacola no se observaron cambios en la utilización de sustratos; ya que tanto en secas como en lluvias la mayor abundancia se cuantificó con metanol ( $5.4 \times 10^6 - 1.89 \times 10^8$  cel/g ST), seguido por el acetato ( $1.9 \times 10^5 - 1.47 \times 10^7$  cel/g ST) y finalmente el hidrógeno ( $9.2 \times 10^4 - 1.61 \times 10^7$  cel/g ST). En el sistema Carretas-Pereyra el orden decreciente en secas fue: metanol ( $2.13 \times 10^6$  cel/g ST) > acetato ( $1.49 \times 10^5$  cel/g ST) > hidrógeno ( $1.14 \times 10^5$  cel/g ST). Durante la época de lluvias el patrón observado fue: metanol ( $2.86 \times 10^7$  cel/g ST) > hidrógeno ( $3.58 \times 10^7$  cel/g ST) > acetato ( $2.04 \times 10^7$  cel/g ST).

A nivel espacial se determinó que la abundancia de las AM se incrementó a mayor profundidad del sedimento; no obstante, las diferencias verticales sólo fueron significativas en el caso del metanol durante la temporada de lluvias en Chantuto-Panzacola ( $p < 0.05$ , Tabla 11).

### **Actividad cinética.**

Cuando se agregó acetato a los sedimentos a una concentración final de 20 mM el objetivo era determinar si era consumido por las poblaciones microbianas anaerobias presentes en los sedimentos, favoreciéndose la sulfatorreducción en presencia de sulfatos en el medio de cultivo (concentración final de 20 mM), y la metanogénesis en un medio sin sulfatos.

En las pruebas cinéticas efectuadas en los sedimentos de ambos sistemas lagunares, primeramente se observó la producción de acetato en los primeros días, aunada con la producción de otros ácidos volátiles (como butirato y propionato) detectados mediante la cromatografía de gases (Fig. 11). Este comportamiento se determinó tanto en presencia como en ausencia de sulfatos en el medio, aunque la generación de acetato fue superior en las pruebas efectuadas con sulfatos.

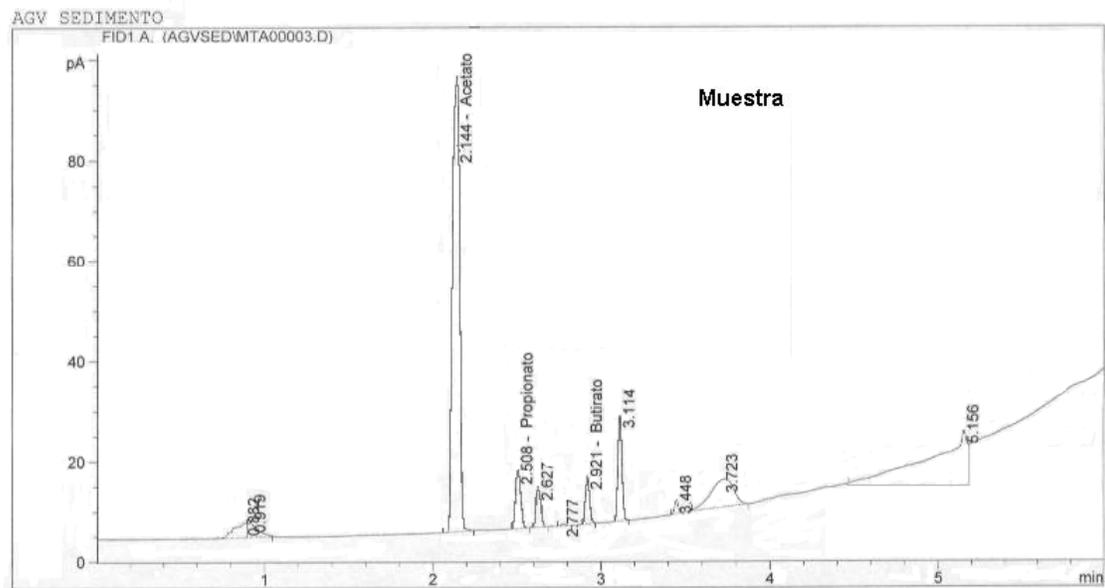
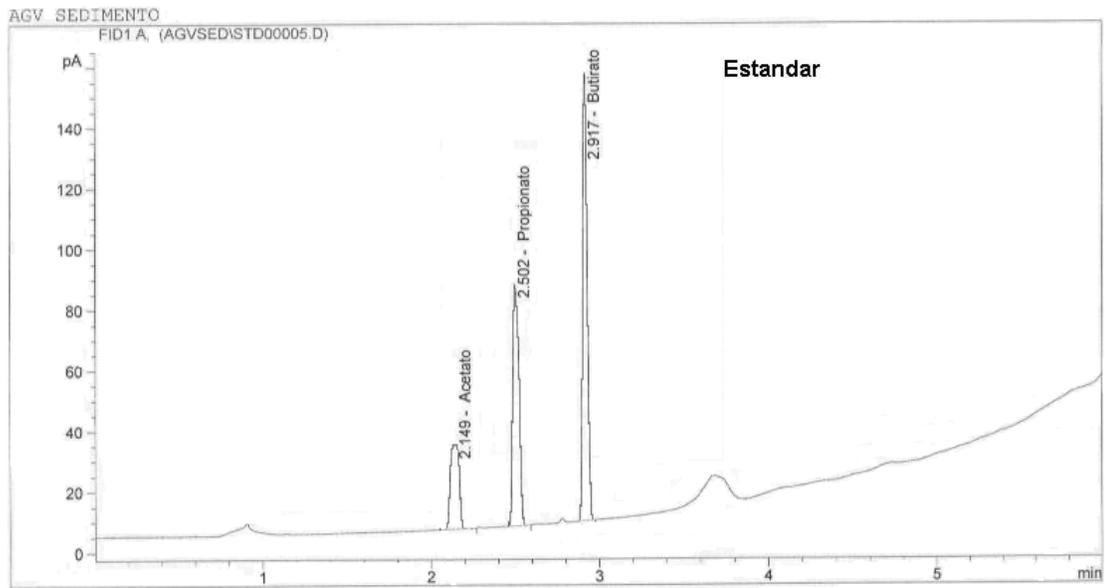


Figura 11. Cromatograma que muestra la producción de acetato y otros ácidos grasos volátiles, propionato y butirato, en las pruebas cinéticas.

Después de la fase de producción de acetato, se comenzó a presentar un consumo del mismo y a partir de los cálculos de la actividad específica se determinó que ésta fue mayor en ambas épocas climáticas en presencia de sulfatos en el medio (Tablas 12-13), por lo que el proceso que se vio favorecido fue la sulfatorreducción.

**Tabla 12. Actividad cinética a partir de acetato, con y sin sulfatos en el medio, calculada para los sedimentos del sistema lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México) en el período 2002-2003**

<b>Laguna Cerritos</b>							
Actividad específica (mM acetato/g SV/día)							
Condiciones del medio	Profundidad cm	Lluvias			Secas		
		Julio	Octubre	Noviembre	Febrero	Mayo	Junio
Con sulfatos	0-6	0.004	0.012	0.033	0.027	0.033	0.034
	6-12	0.002	0.011	0.013	0.049	0.020	0.014
Sin sulfatos	0-6	0.013	0.014	0.036	0.020	0.002	0.017
	6-12	0.032	0.021	0.018	0.033	0.005	0.020

<b>Laguna Campón</b>							
Lluvias							
Con sulfatos	Profundidad cm	Lluvias			Secas		
		Julio	Octubre	Noviembre	Febrero	Mayo	Junio
Con sulfatos	0-6	0.007	0.009	0.014	0.081	0.091	0.041
	6-12	0.002	0.007	0.017	0.027	0.070	0.008
Sin sulfatos	0-6	0.031	0.007	0.006	0.022	0.002	0.012
	6-12	0.045	0.027	0.032	0.027	0.010	0.013

**Tabla 13. Actividad cinética a partir de acetato, con y sin sulfatos en el medio, calculada para los sedimentos del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México) en el período 2002-2003**

<b>Laguna Pereyra</b>							
Lluvias							
Actividad específica mM acetato/g SV/día	Profundidad cm	Lluvias			Secas		
		Julio	Octubre	Noviembre	Febrero	Mayo	Junio
Con sulfatos	0-6	0.008	0.009	0.017	0.081	0.070	0.015
	6-12	0.009	0.007	0.014	0.027	0.091	0.005
Sin sulfatos	0-6	0.031	0.003	0.006	0.022	0.014	0.012
	6-12	0.045	0.010	0.022	0.027	0.011	0.013

<b>Laguna Bobo</b>							
Lluvias							
Con sulfatos	Profundidad cm	Lluvias			Secas		
		Julio	Octubre	Noviembre	Febrero	Mayo	Junio
Con sulfatos	0-6	0.011	0.007	0.004	0.034	0.041	0.027
	6-12	0.012	0.002	0.002	0.014	0.008	0.049
Sin sulfatos	0-6	0.007	0.018	0.014	0.002	0.017	0.002
	6-12	0.027	0.036	0.021	0.004	0.020	0.010

La actividad específica sulfatorreductora (considerada como la que se presentó en los medios con sulfatos), tuvo diferencias temporales significativas en ambos sistemas lagunares ( $\rho < 0.05$ ). En Chantuto-Panzacola en los meses de secas se determinó una actividad específica promedio de 0.041 mM acetato/g SV/día, en comparación con 0.010 mM acetato/g SV/día en la temporada de lluvias ( $\rho = 0.00$ ;  $r = 0.95$ ). En el caso de Carretas-Pereyra los promedios fueron de 0.038 y 0.008 mM acetato/g SV/día en secas y lluvias, respectivamente ( $\rho = 0.00$ ;  $r = 0.92$ ).

La actividad específica metanogénica (aquella que se determinó en los medios sin sulfatos) no presentó diferencias significativas entre las épocas climáticas analizadas. Sin embargo, se observó que dicha actividad se incrementó en los meses del período de lluvias, con un promedio de 0.023 mM acetato/g SV/día para Chantuto-Panzacola y de 0.019 mM acetato/g SV/día en Carretas-Pereyra. En la temporada de secas los promedios registrados fueron de 0.015 mM acetato/g SV/día y 0.012 mM acetato/g SV/día en Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, respectivamente.

Aunado a lo anterior, se estableció que la actividad a partir de acetato en los medios con sulfatos fue superior en el estrato de los 0-6 cm del sedimento y disminuyó al aumentar la profundidad del mismo (6-12 cm). En el caso de los medios sin sulfatos se determinó un comportamiento inverso. Dicho patrón se cumplió en ambas épocas climáticas para los dos ecosistemas lagunares analizados. No obstante, las variaciones verticales no fueron significativas (Tabla 14).

**Tabla 14. Análisis de varianza para determinar diferencias espaciales de la actividad específica, con y sin sulfatos en el medio, en los sedimentos de los sistemas lagunares Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.**

<b>Sistema lagunar Chantuto-Panzacola</b>								
Actividad específica (mM acetato/g SV/día)								
Secas					Lluvias			
Condiciones del medio	Media				Media			
	0-6 cm	6-12 cm	<i>p</i>	<i>r</i>	0-6 cm	6-12 cm	<i>p</i>	<i>r</i>
Con sulfatos	0.053	0.031	0.2	0.23	0.013	0.008	0.38	0.13
Sin sulfatos	0.012	0.017	0.36	0.13	0.017	0.029	0.11	0.34

<b>Sistema lagunar Carretas-Pereyra</b>								
Actividad específica (mM acetato/g SV/día)								
Secas					Lluvias			
Condiciones del medio	Media				Media			
	0-6 cm	6-12 cm	<i>p</i>	<i>r</i>	0-6 cm	6-12 cm	<i>p</i>	<i>r</i>
Con sulfatos	0.044	0.032	0.48	0.1	0.009	0.007	0.51	0.09
Sin sulfatos	0.011	0.014	0.59	0.07	0.013	0.026	0.06	0.46

## **Análisis moleculares.**

### a) Extracción.

La extracción del ADN total de las muestras se efectuó con 1.5 g de sedimento húmedo. En el caso del estrato sedimentario de los 6-12 cm de las lagunas de Campón y Pereyra, se llevaron a cabo de uno a dos lavados adicionales a lo establecido en el protocolo del kit con la solución S4 para eliminar la interferencia de los ácidos húmicos presentes. Asimismo se extrajo del ADN en los cultivos de propagación de *Desulfovibrio* y *Methanosarcina mazei* con el Kit de Purificación de ADN Wizard® Genomic (Promega) para ser utilizado como control.

Como resultado de la extracción, se obtuvo un producto con un tamaño superior a las 10,000 pb, el cual fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1x (Fig. 12).

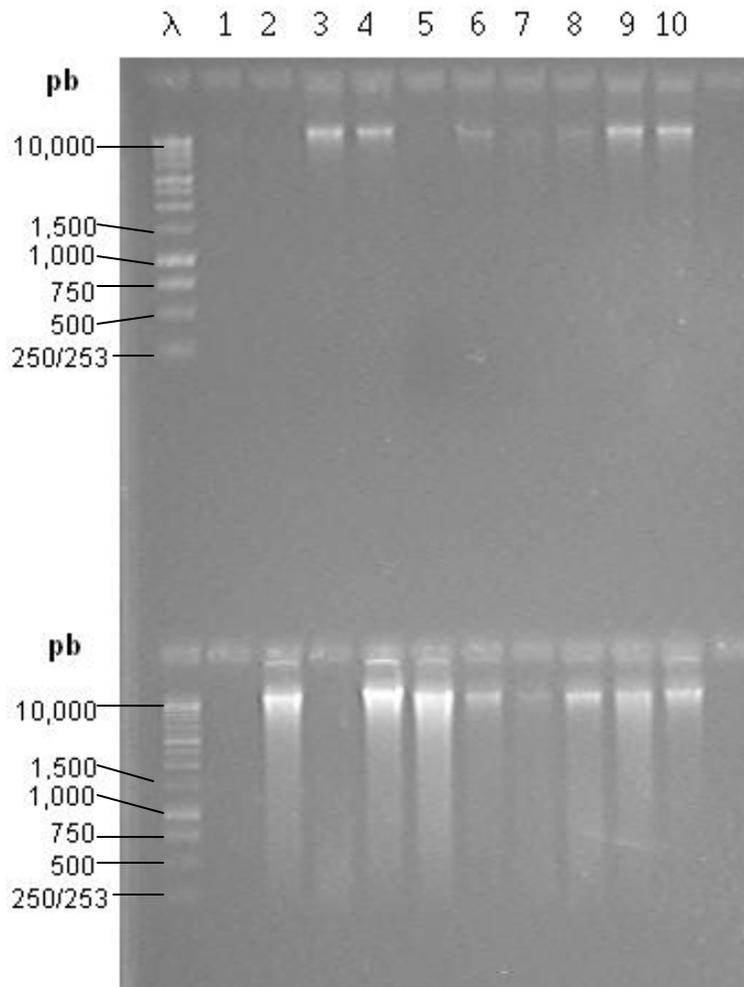


Figura 12. Resultado de la extracción del ADN total de las muestras de los sedimentos de las lagunas de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas.

Carriles superiores: λ = ladder 10,000 pb; 1 = O1; 2 = O2; 3 = O3; 4 = O4; 5 = O5; 6 = O6; 7 = O7; 8 = O8; 9 = CA; 10 = CA.

Carriles inferiores: λ = ladder 10,000 pb; 1= M1; 2 = M2; 3 = M3; 4 = M4; 5 = M5; 6 = M6; 7 = M7; 8 = M8; 9 = CB; 10 = CB.

Claves: O = octubre. M = mayo. CA = control AM; CB = control BSR

1 = Pereyra superficie; 2 = Pereyra fondo; 3 = Bobo superficie; 4 = Bobo fondo; 5 = Campón superficie; 6 = Campón fondo; 7 = Cerritos superficie; 8 = Cerritos fondo

b) PCR.

Con el ADN molde, obtenido a partir de la extracción, se llevó a cabo la PCR con los primers específicos tanto para las BSR como para las AM en las muestras y en los controles. A partir de esta prueba se obtuvo en el caso de las BSR un fragmento aproximado de 522 pb, mientras que el fragmento de las AM fue aproximadamente de 886 pb (Fig. 13).

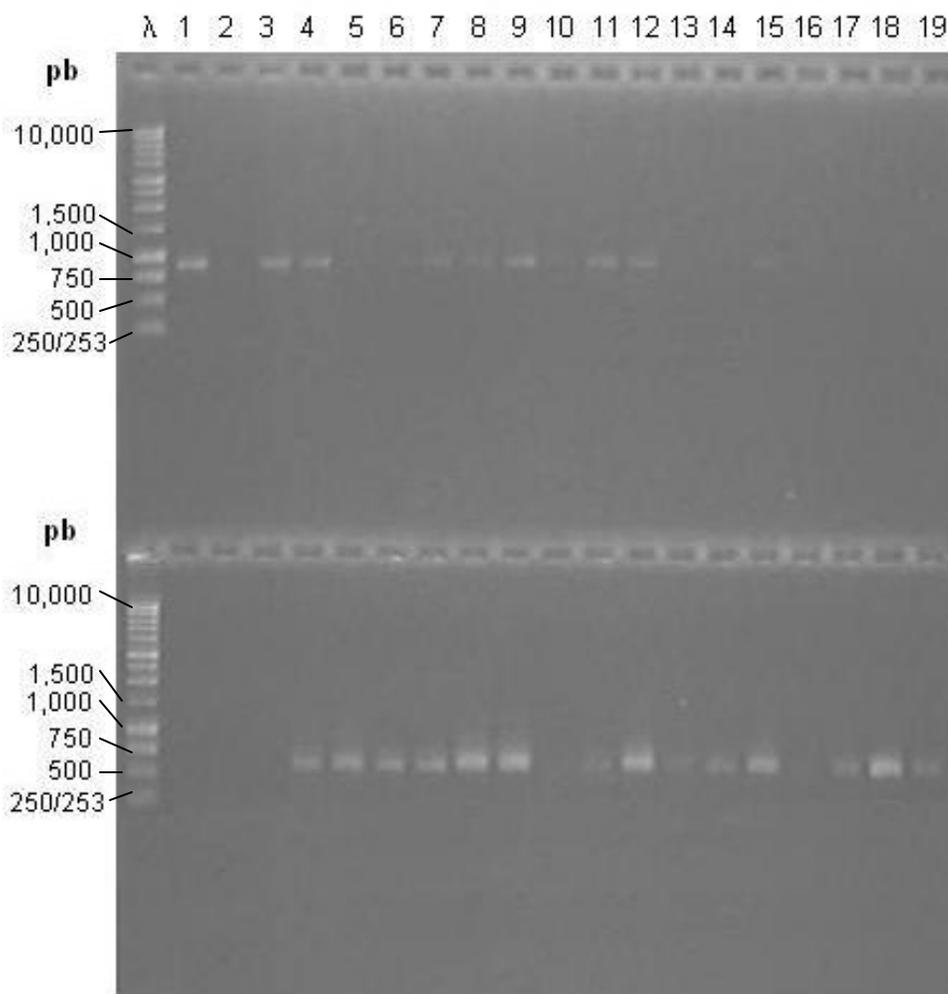


Figura 13. Resultado de la PCR del gen 16S rARN correspondiente a las muestras de los meses de mayo y octubre, así como controles.

Carriles superiores: arqueas metanogénicas.  $\lambda$  = ladder 10,000 pb; 1= M1; 2 = M2; 3 = M3; 4 = M4; 5 = M5; 6 = M6; 7 = M7; 8 = M8; 9 = O1; 10 = O2; 11 = O3; 12 = O4; 13 = O5; 14 = O6; 15 = O7; 16 = O8; 17 = CA; 18 = CA; 19 = CA.

Carriles inferiores: bacterias sulfatorreductoras  $\lambda$  = ladder 10,000 pb; 1= M1; 2 = M2; 3 = M3; 4 = M4; 5 = M5; 6 = M6; 7 = M7; 8 = M8; 9 = O1; 10 = O2; 11 = O3; 12 = O4; 13 = O5; 14 = O6; 15 = O7; 16 = O8; 17 = CB; 18 = CB; 19 = CB.

Claves: O = octubre. M = mayo. CA = control AM; CB = control BSR

1 = Pereyra superficie; 2 = Pereyra fondo; 3 = Bobo superficie; 4 = Bobo fondo; 5 = Campón superficie; 6 = Campón fondo; 7 = Cerritos superficie; 8 = Cerritos fondo

c) RFLP.

Con la finalidad de uniformizar las reacciones de digestión con 5 U de cada una de las enzimas propuestas, se efectuaron pruebas con diferentes concentraciones del ADN del bacteriófago lambda como control: 125 y 250 ng de ADN en un volumen final de 30  $\mu$ l.

A partir de dichos análisis se obtuvo que 5 U de las enzimas *AluI* y *BfaI* producían un patrón de bandas mejor definido con 250 ng de ADN en el control, mientras que 5 U de las enzimas *RsaI*, *HaeIII* y *Sau3* daban mejores resultados con 125 ng de ADN (Fig.14).

Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN en los productos purificados (dilución 1/10) de la PCR en un Biofotómetro Eppendorf (absorbancia 260 nm) con el programa dsDNA. Las muestras que tuvieron una concentración de ADN inferior a 125 ng se amplificaron nuevamente por PCR, pero se purificaron a un volumen final aproximado de 30  $\mu$ l para concentrar el ADN.

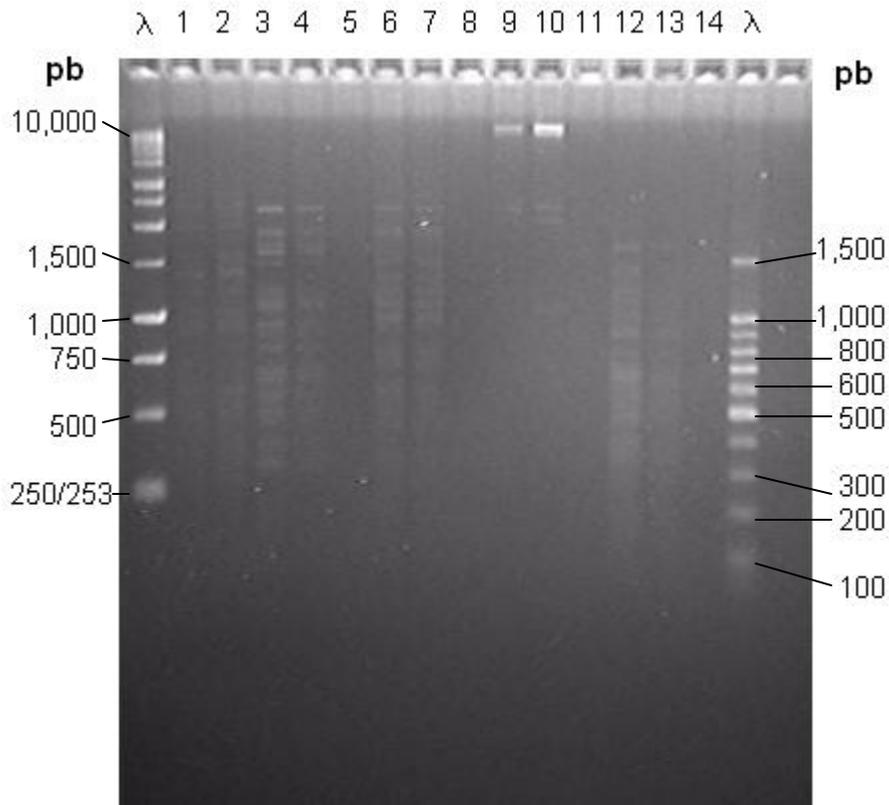


Figura 14. Resultado del RFLP con diferentes enzimas de digestión utilizando como control el ADN del bacteriófago lambda con dos concentraciones diferentes.

Carriles:  $\lambda$  = ladder 10,000 pb; 1 = *AluI*, 125 ng; 2 = *AluI*, 250 ng; 3 = *RsaI*, 125 ng; 4 = *RsaI*, 250 ng; 5 = vacío; 6 = *Sau3I*, 125 ng; 7 = *Sau3I*, 250 ng; 8 = vacío; 9 = *BfaI*, 125 ng; 10 = *BfaI*, 250 ng; 11 = vacío; 12 = *HaeIII*, 125 ng; 13 = *HaeIII*, 250 ng; 14 = vacío;  $\lambda$  = ladder 100 pb

El resultado del análisis del RFLP para las BSR con las enzimas *BfaI* y *HaeIII* se muestra en las Figuras 15 y 16. En las Figuras 17-18 se observa el patrón de bandas que resultó con las enzimas *RsaI* y *AluI* en el RFLP de las AM.

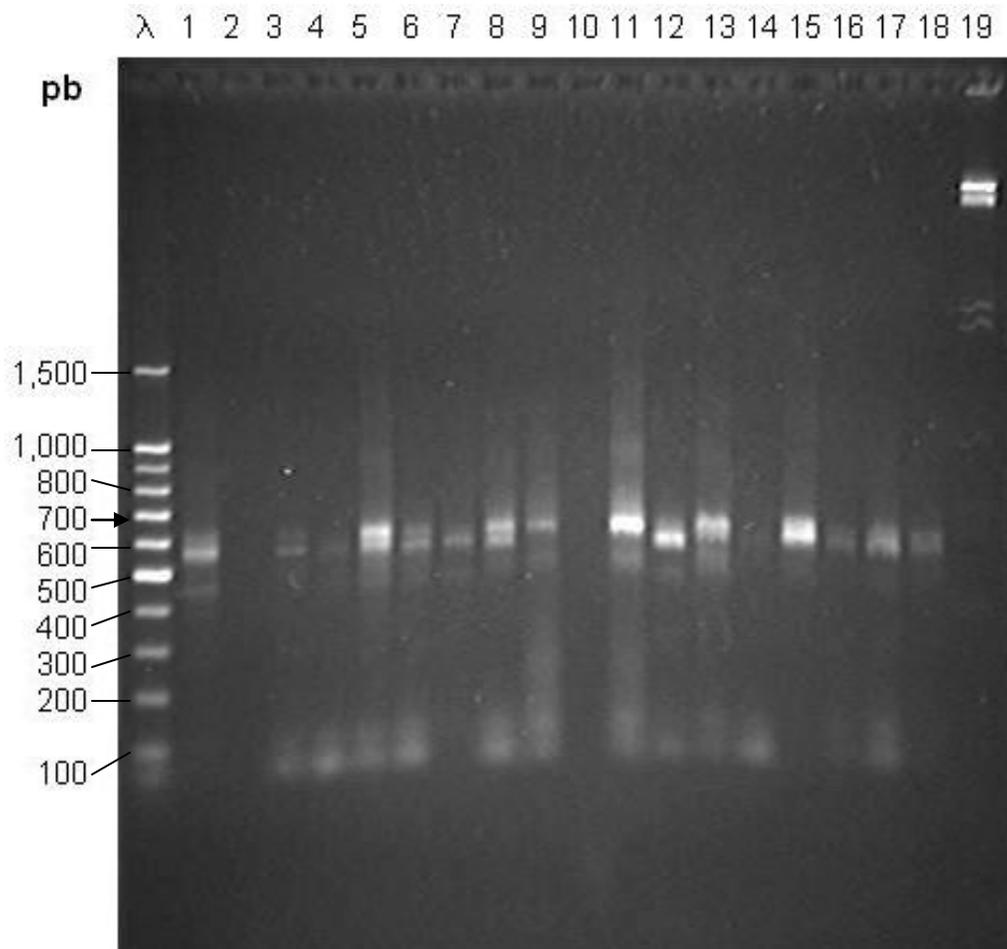


Figura 15. Resultado del RFLP de las BSR con la enzima de restricción *Bfal*.

Carriles:  $\lambda$  = ladder 100 pb; 1 = M1; 2 = O1; 3 = M2; 4 = O2; 5 = M3; 6 = O3; 7 = M4; 8 = O4; 9 = M5; 10 = vacío; 11 = O5; 12 = M6; 13 = O6; 14 = M7; 15 = O7; 16 = M8; 17 = O8; 18 = CB; 19 = bacteriófago lambda 250 ng.

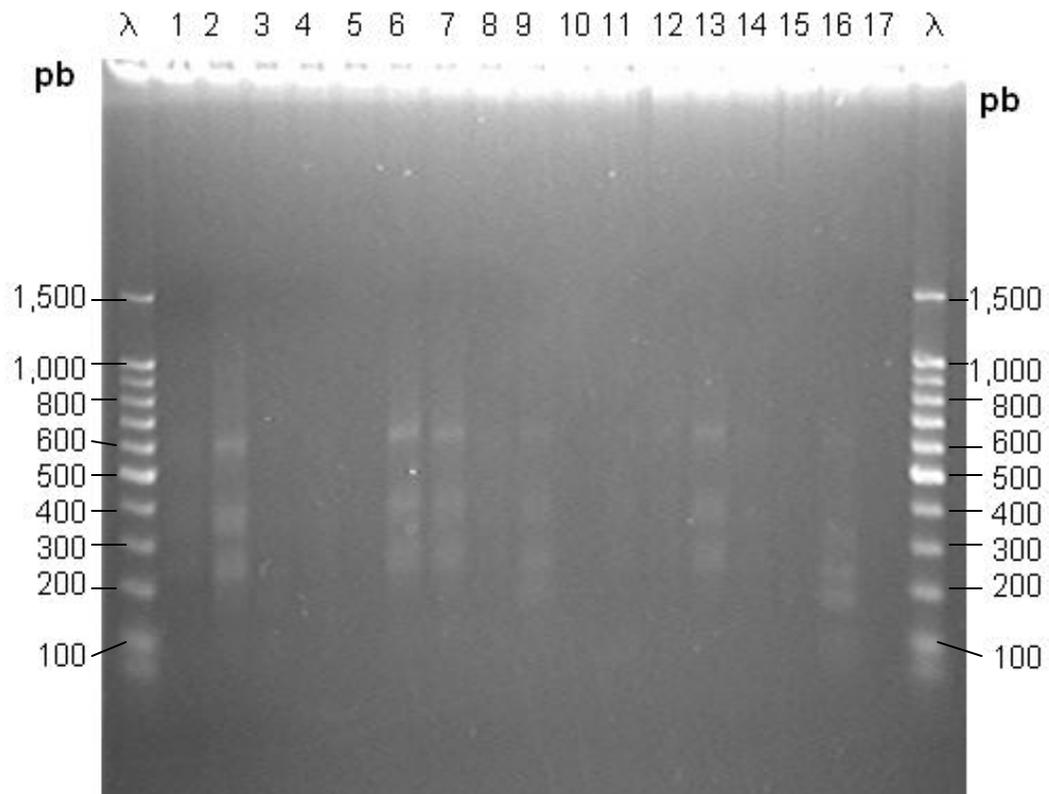


Figura 16. Resultado del RFLP de las BSR con la enzima de restricción *HaeIII*.

Carriles: λ = ladder 100 pb; 1 = M1; 2 = O1; 3 = M2; 4 = O2; 5 = M3; 6 = O3; 7 = M4; 8 = O4; 9 = M5; 10 = O5; 11 = M6; 12 = O6; 13 = M7; 14 = O7; 15 = M8; 16 = O8; 17 = vacío; λ = ladder 100 pb.

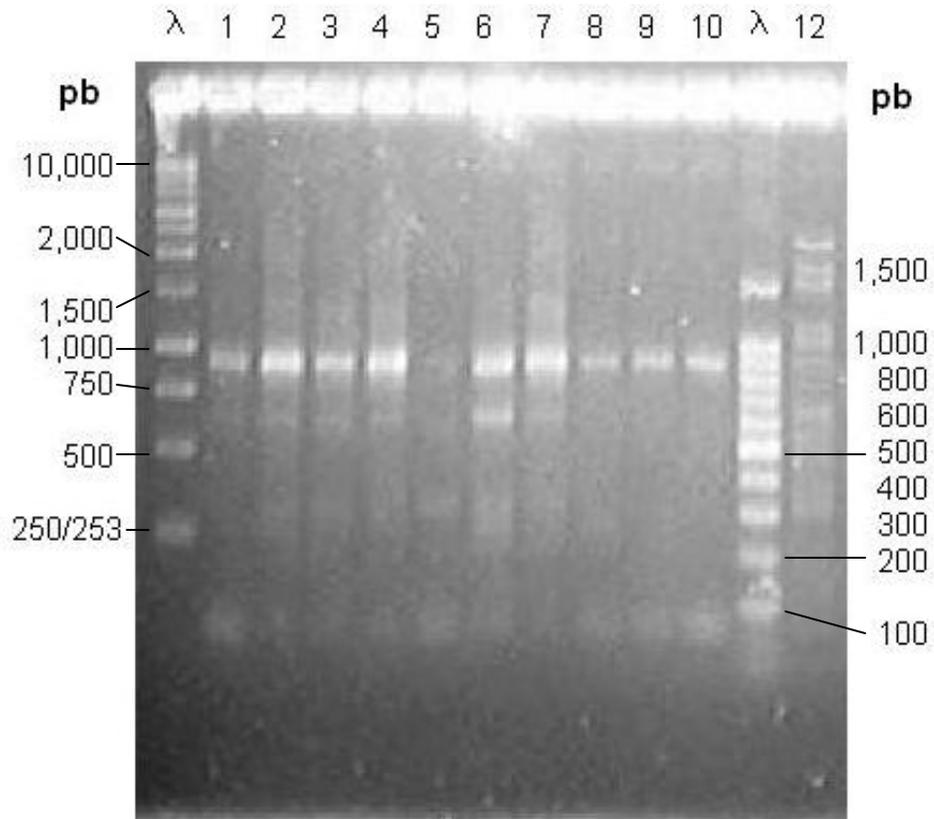


Figura 17. Resultado del RFLP de las AM con la enzima de restricción *RsaI*.

Carriles: λ = ladder 10,000 pb; 1 = M1; 2 = O1; 3 = M2; 4 = O2; 5 = M3; 6 = O3; 7 = M4; 8 = O4; 9 = M5; 10 = O5; λ = ladder 100 pb; 12 = bacteriófago lambda 125 ng.

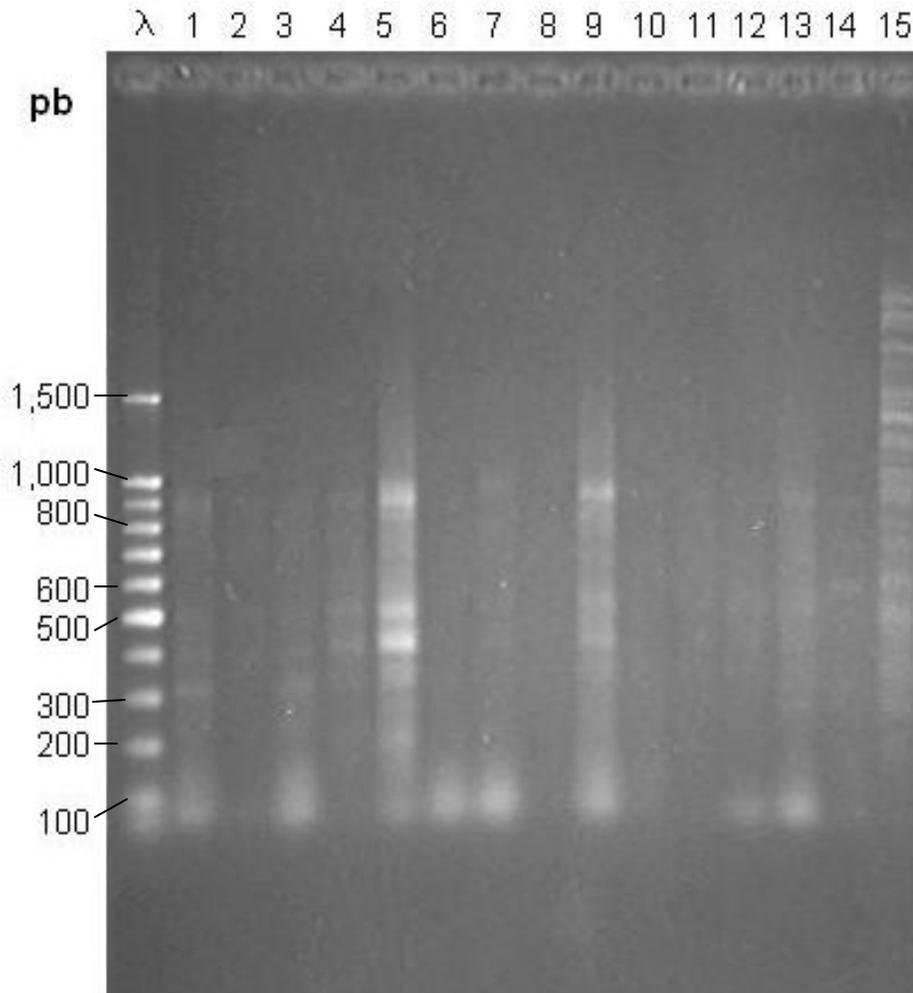


Figura 18. Resultado del RFLP de las AM con la enzima de restricción *A**lu*.

Carriles: λ = ladder 100 pb; 1 = M1; 2 = O1; 3 = M2; 4 = O2; 5 = M3; 6 = O3; 7 = M4; 8 = O4; 9 = M5; 10 = O5; 11 = M6; 12 = O6; 13 = M7; 14 = CA; 15 = bacteriófago lambda 250 ng.

#### **9.4. Análisis estadístico.**

##### **Relación densidad microbiana-características ambientales.**

En la Tabla 15 se presentan los resultados de las correlaciones efectuadas entre las variables fisicoquímicas con las densidades de las BSR y de las AM. Con base en la tabla se observa que las BSR tienden a correlacionarse más frecuentemente de forma significativa con las variables de salinidad, contenido de sulfatos y el pH. Con el resto de las variables se correlacionan menos frecuentemente. De manera similar las AM se correlacionan en mayor grado con la salinidad y la concentración de sulfatos. No obstante lo anterior, la asociación entre las BSR y las variables ambientales tienden a ser directas, mientras que la asociación entre las AM y las características ambientales tiende a ser inversa. La concentración de sólidos volátiles en el sedimento y la de los carbohidratos en el agua intersticial no mostraron correlación alguna con las abundancias de la microbiota anaerobia analizada.

Asimismo el análisis de correlación de Spearman indicó que la abundancia de las BSR y la de las AM tiene una segregación significativa en el caso del acetato ( $n= 48$ ;  $r_s= -0.7015$ ;  $P= 0.0000$ ) y del hidrógeno ( $n= 48$ ;  $r_s= -0.7381$ ;  $P= 0.0000$ ), que puede ser atribuida a un proceso de competencia.

**Tabla 15. Análisis de Spearman para determinar correlaciones entre el número de BSR y AM con las variables ambientales determinadas en el sedimento de los sistemas lagunares de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas.**

Variable Ambiental	Bacterias Sulfatorreductoras				Arqueas metanogénicas		
	Lactato	Propionato	Acetato	Hidrógeno	Metanol	Acetato	Hidrógeno
Temperatura	0.15	0.43 *	0.14	0.28	-0.28	-0.33 *	-0.37 *
Salinidad	0.68 *	0.86 *	0.7 *	0.77	-0.73 *	-0.78 *	-0.71 *
Sulfatos	0.72 *	0.83 *	0.74 *	0.8	-0.73 *	-0.82 *	-0.78 *
pH	0.64 *	0.52 *	0.69 *	0.59	-0.49 *	-0.53 *	-0.66 *
Eh	-0.16	-0.27	-0.25	-0.24	0.37 *	0.30 *	0.24
Sólidos totales	0.32	0.17	0.33 *	0.16	-0.12	0.14	-0.28
Sólidos volátiles	0.06	-0.07	0.03	-0.16	-0.01	-0.16	-0.1
Carbono orgánico	-0.31	-0.17	-0.18	-0.16	0.09	0.06	0.30 *
Carbohidratos	-0.03	0	0.13	0.1	-0.18	-0.1	-0.11

\*, diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

n = 48

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1 Variables fisicoquímicas.

Las temperaturas registradas en el sedimento de los sistemas lagunares de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra en el transcurso del presente estudio reflejaron los cambios estacionales existentes a lo largo del año en la zona, siendo el estiaje la época más cálida y la de lluvias la más fría (Fig. 19); sin embargo, las fluctuaciones no fueron estadísticamente significativas.

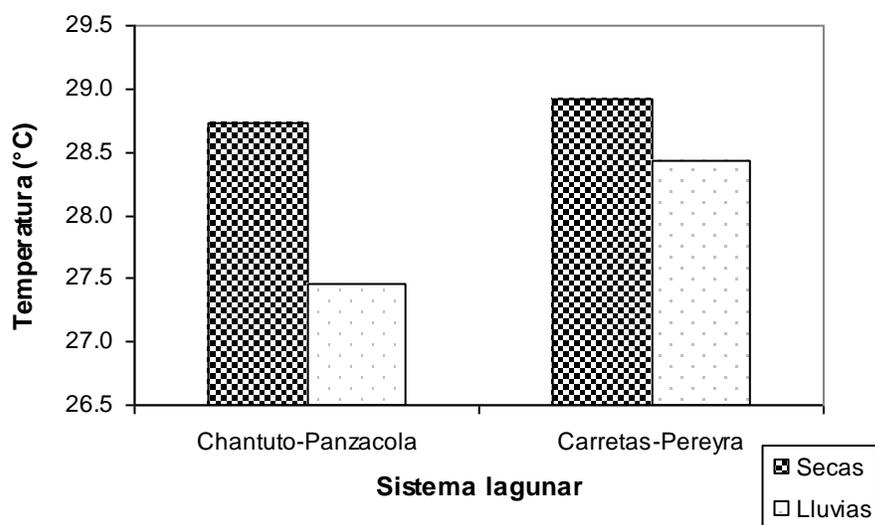


Figura 19. Variación temporal de la temperatura promedio en el sedimento de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

A pesar de las variaciones temporales (secas y lluvias), el hábitat sedimentario mostró una constancia relativa de la temperatura con respecto a la profundidad, la cual pudo ser mantenida por la capacidad térmica del agua, que aminora los cambios en el sedimento (Figs. 20-21).

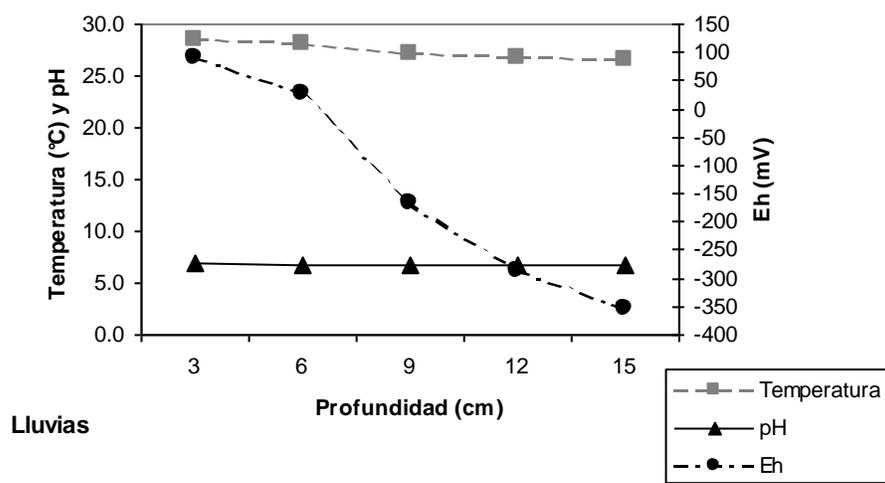
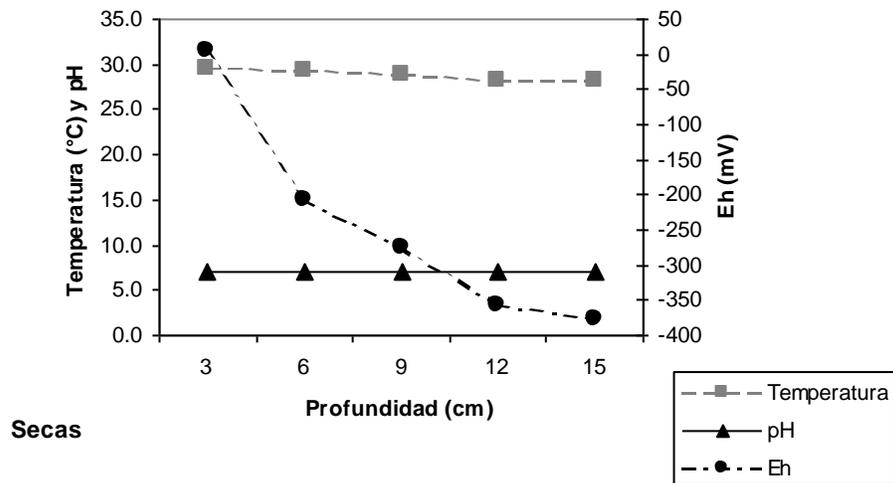


Figura 20. Variación espacial de la temperatura, pH y Eh promedio durante las temporadas de secas y lluvias en el sedimento de las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

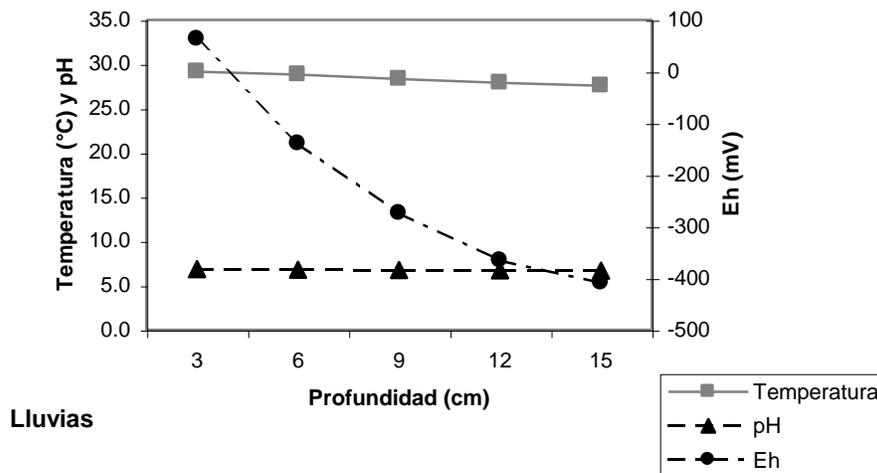
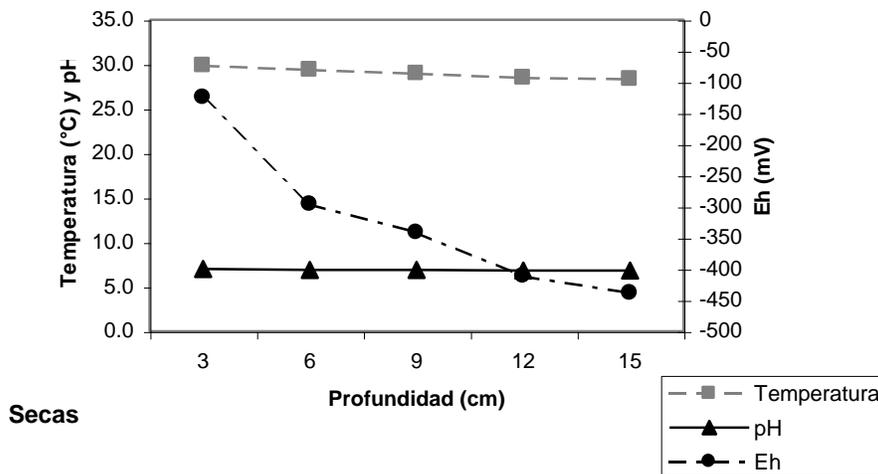


Figura 21. Variación espacial de la temperatura, pH y Eh promedio durante las temporadas de secas y lluvias en el sedimento de las lagunas del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

Los intervalos de temperatura cuantificados en las lagunas de ambos sistemas fueron característicos de ambientes marinos y de humedales localizados en latitudes tropicales (Neue *et al.*, 1997); no obstante fueron inferiores al intervalo reportado

para sedimentos de manglares localizados en la India, el cual estuvo entre 30 y 35°C, ( Mohanraju *et al.*, 1997).

Los cambios estacionales en los valores del pH en el sedimento de las lagunas estudiadas pueden atribuirse también a la influencia de las temporadas de secas y lluvias. En los meses de mayor temperatura aumenta la tasa de evaporación y es mayor la influencia marina en las lagunas, creando condiciones neutras y alcalinas; por el contrario, en el período de lluvias el incremento en el aporte fluvial y la disminución de la influencia marina propició en las lagunas la presencia de características ácidas (Fig. 22).

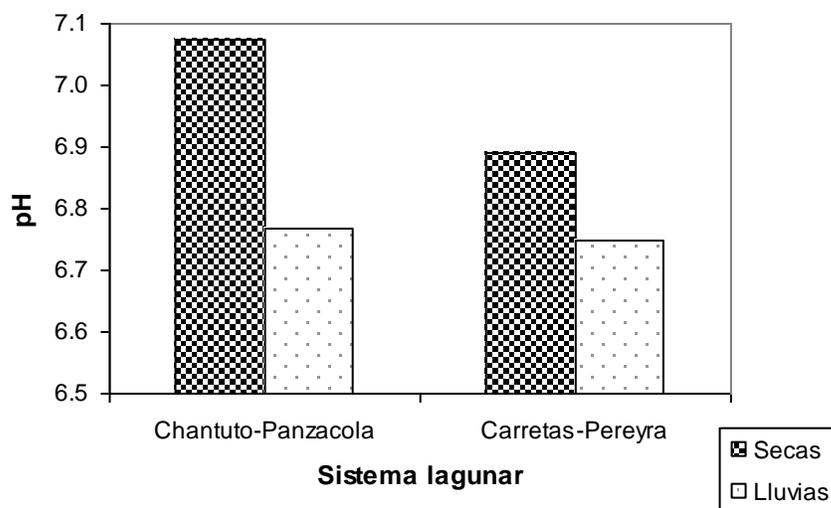


Figura 22. Variación temporal del pH promedio en el sedimento de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

Aunado a la influencia de las épocas climáticas, el descenso del pH con la profundidad (Figs. 20-21), puede atribuirse a la liberación de bióxido de carbono e hidrógeno, durante los procesos de fermentación efectuados por la microbiota del sistema y como resultado del metabolismo de las BSR que producen ácido sulfhídrico, mientras que la utilización de hidrógeno por diferentes poblaciones de BSR y AM contribuiría a incrementar el pH (Zepp Falz *et al.*, 1999).

Los sedimentos estuvieron generalmente más oxidados durante la temporada de lluvias en las lagunas analizadas debido a que fueron perturbados cuando se incrementaron los procesos de circulación en la columna de agua como resultado de un mayor aporte fluvial. Lo anterior provocó que los sedimentos se resuspendieran, aumentando la turbidez de la columna de agua y la porosidad del sedimento. Estas condiciones determinaron un cambio electroquímico hacia un Eh más positivo; posteriormente el potencial redox disminuyó nuevamente, como consecuencia de la redepositación de los sedimentos y la disminución de la porosidad (Fig. 23).

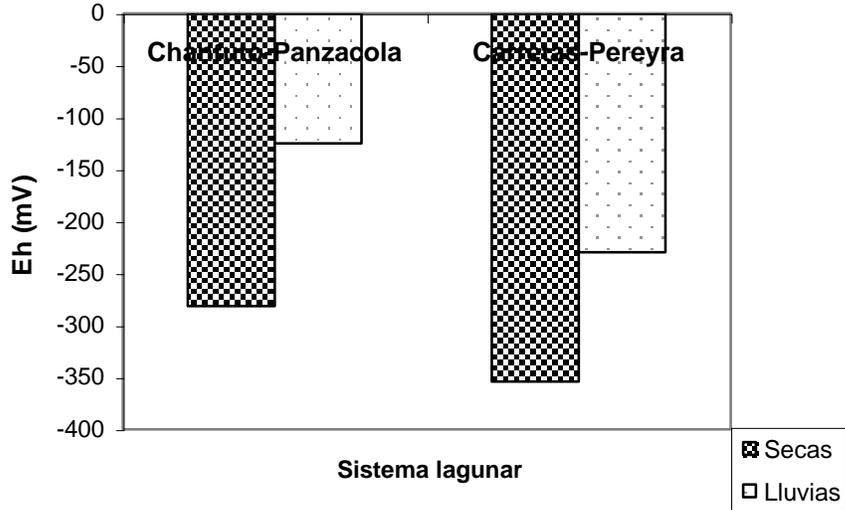


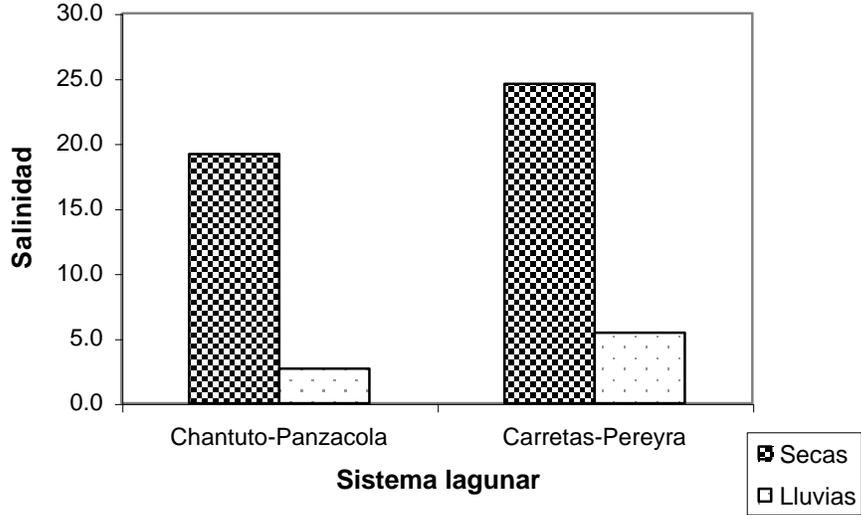
Figura 23. Variación temporal del Eh promedio en el sedimento de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

En las Figuras 20 y 21 se presenta el comportamiento espacial del Eh, observándose que éste tuvo grandes variaciones verticales, haciéndose más negativo al aumentar la profundidad de la fase sedimentaria debido a una disminución de la tasa de difusión del oxígeno en el agua intersticial (Gould *et al.*, 1994). Los intervalos de Eh cuantificados fueron más reductores en comparación con los reportados para otros sedimentos de color negro, que presentan enriquecimiento de materia orgánica y condiciones anaerobias (Tabla 16).

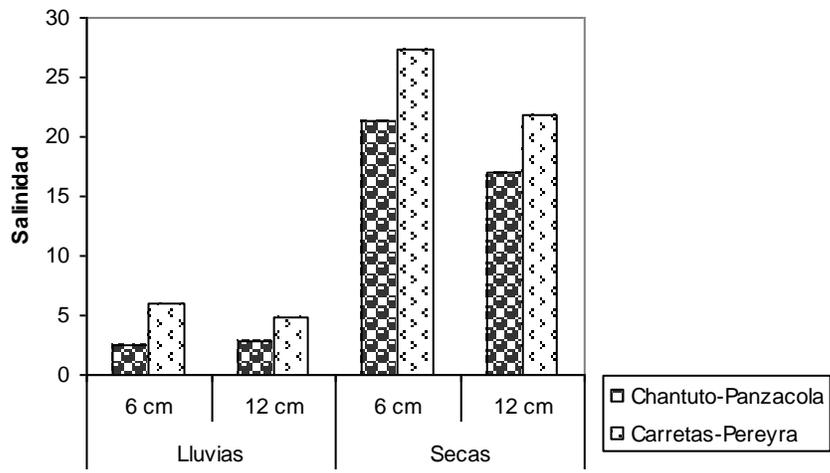
**Tabla 16. Intervalos del potencial redox (Eh) en sedimentos de diferentes ambientes acuáticos.**

Eh mV	Características del sedimento	Autor
-150 a -175 +150 a -160	Sedimento sin raíces de <i>S. alterniflora</i> Sedimento con raíces de <i>S. alterniflora</i>	Howes <i>et al.</i> (1981)
+100 a -100 -100 a -200	Limo de color gris Limo de color negro	Teal & Kanwisher (1962)
+300 a -190	Sedimentos costeros	Sorensen <i>et al.</i> (1979)
-150	Sedimento de color café-negro	Zeikus & Winfrey (1976)
-100 a -200	Sedimentos costeros cercanos a un cultivo de mejillón	Gunnarsson & Rönnow (1982)
-150 a -158	Sedimentos de una bahía	Miller <i>et al.</i> (1979)
+140 a -450 +100 a -490	Chantuto-Panzacola Carretas-Pereyra	Este estudio Este estudio

En los meses asociados a la temporada de secas (febrero, mayo y junio), el incremento de la salinidad del agua intersticial fue resultado de una mayor evaporación e intercambio de la laguna con el océano a través de la boca de comunicación. En los meses de julio, octubre y noviembre, la salinidad disminuyó al aumentar la descarga fluvial y la precipitación. Asimismo, como los primeros centímetros del sedimento tienen un mayor intercambio con la columna de agua, la salinidad en el estrato de los 0-6 cm fue superior en comparación con el estrato localizado a mayor profundidad (Fig. 24).



a) Temporal



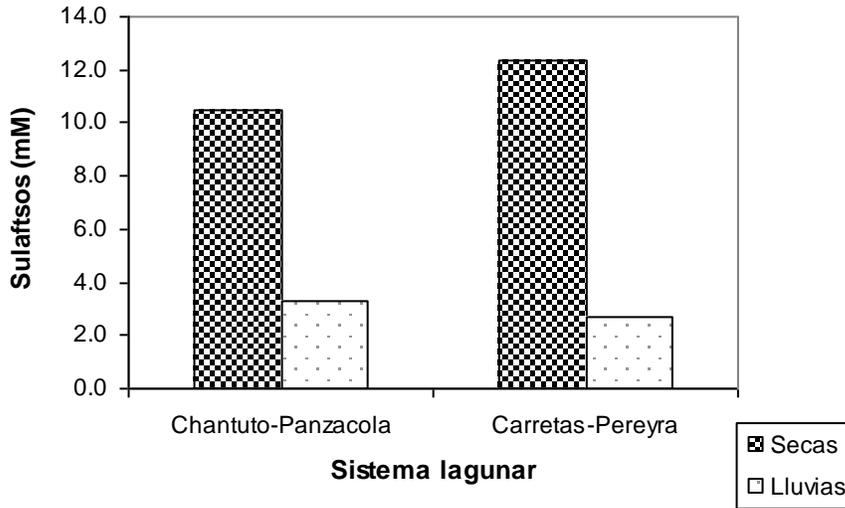
b) Espacial

Figura 24. Variación temporal y espacial de la salinidad promedio en el agua intersticial de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

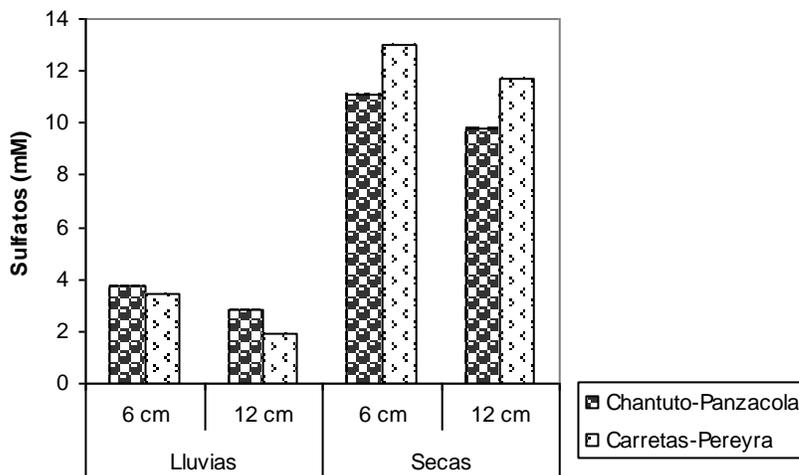
La salinidad en las lagunas costeras varía a lo largo de ciclos anuales, dependiendo del clima local, de los escurrimientos dulceacuícolas del continente, de la geomorfología de la laguna, de su conexión con el mar y de la influencia de la marea.

Knoppers y Kjerfve (1997) mencionan que los pulsos estacionales de las entradas de agua dulce tienen un profundo impacto en la ecología de las lagunas costeras porque además de controlar la salinidad, aumentan el nivel de la columna de agua y mantienen la boca de comunicación abierta.

Junto con el cloro y el sodio, los sulfatos representan el tercer ión más importante de los medios marinos; por tal motivo, la variación de su concentración suele estar relacionada directamente con las fluctuaciones de la salinidad y a la vez con la actividad sulfatorreductora, ya que son el aceptor terminal de electrones de dicho proceso. Los cambios en las concentraciones de sulfatos en el agua intersticial estuvieron directamente relacionados con las variaciones de la salinidad, por lo cual la influencia dulceacuícola, que se incrementó en la temporada de lluvias fue el factor responsable del descenso de la concentración de sulfatos, al diluirse éstos con la entrada de agua dulce. Cuando el aporte dulceacuícola disminuyó, la cantidad de sulfatos aumentó nuevamente. A nivel espacial, la relación directa de la concentración de sulfatos con la salinidad se mantuvo, por lo cual, éste disminuyó a mayor profundidad (Fig. 25). La presencia de una mayor cantidad de sulfatos en los primeros centímetros del sedimento contribuyó a que la abundancia de BSR fuera superior en el estrato de los 0-6 cm.



a) Temporal



b) Espacial

Figura 25. Variación temporal y espacial de la concentración de sulfatos promedio en el agua intersticial de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

Las concentraciones de sulfatos cuantificadas en el presente estudio fueron semejantes a los intervalos reportados para sedimentos estuarinos y de marismas con *Spartina alterniflora* donde abundan las BSR (Tabla 17). A pesar de que en el mes de octubre la salinidad de los sedimentos lagunares fue cero y en el mes de

mayo alcanzó valores de hasta 36, las concentraciones de sulfatos no se igualaron a las reportadas en sistemas netamente dulceacuícolas (lagos) o marinos (bahías).

**Tabla 17. Concentración de sulfatos en sedimentos de diferentes ambientes acuáticos**

SO <sub>4</sub> mM	Condiciones del medio	Autor
0.025 a 0.186	Sedimentos de un lago eutrófico	Phelps & Zeikus (1985)
< 0.01 a > 30	Sedimentos intermareales de una bahía contaminada	Mountfort & Asher (1981)
< 2.5 ~ 15	Sedimentos de marismas Sedimentos intermareales	Banat & Nedwell (1983)
22 a 25	Sedimentos del Golfo de Maine	Hines <i>et al.</i> (1991)
8 a 22	Sedimentos de <i>Spartina alterniflora</i> corta	Howes (1985)
10	Sedimentos de <i>Spartina alterniflora</i> larga	King & Wiebe (1980)
12 5 a 15	Sedimentos de <i>Spartina alterniflora</i> larga Sedimentos de <i>Spartina alterniflora</i> corta	Sorensen <i>et al.</i> (1979)
21.8 a 28.3	Sedimentos marinos con profundidades de 0 a 35 cm	Kosiur & Walford (1979)
1.70 a 13.80 0.40 a 14.30	Sedimentos de Chantuto-Panzacola Sedimentos de Carretas-Pereyra	Este estudio Este estudio

En lo que respecta a la distribución de los sólidos totales y volátiles, éstos en general disminuyeron en la temporada de lluvias por el efecto del arrastre de los ríos. Esta misma situación originó que su concentración descendiera en los primeros centímetros del sedimento y que fueran resuspendidos en la columna de agua (Fig. 26). En los sedimentos de las lagunas de Chantuto-Panzacola los sólidos volátiles representaron del 9.56-89.87% en lluvias, mientras que en secas fueron entre 4.71-

36.16%. En Carretas-Pereyra representaron del 8.11-58.12% en los meses de lluvias; por el contrario, en secas fueron del 16.43-100%. En el caso del sistema Carretas-Pereyra los contenidos máximos de sólidos volátiles fueron semejantes a los promedios registrados en un humedal herbáceo dulceacuícola en Florida, donde se calculó que los sólidos volátiles representaban el 59.6%, mientras que en los sedimentos de un lago eutrófico eran el 88.4% (Dévai *et al.*, 1996).

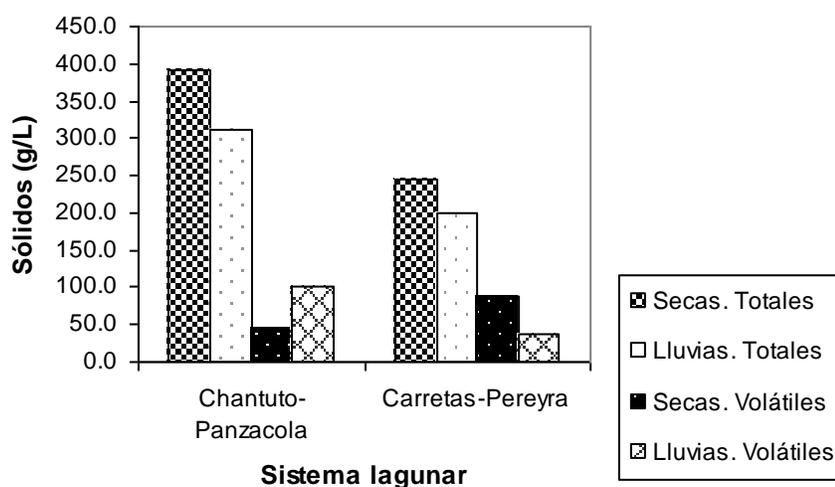


Figura 26. Variación temporal y espacial del contenido de sólidos totales promedio en el sedimento de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

Las fracciones orgánicas (carbono orgánico y carbohidratos) fueron aportadas principalmente durante la temporada de lluvias por los ríos que arrastran el material orgánico de origen terrígeno y de la zona de manglares adyacentes (Fig. 27). En la laguna de Cerritos también fue importante el aporte originado por la presencia de una gran cantidad de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en la misma época climática.

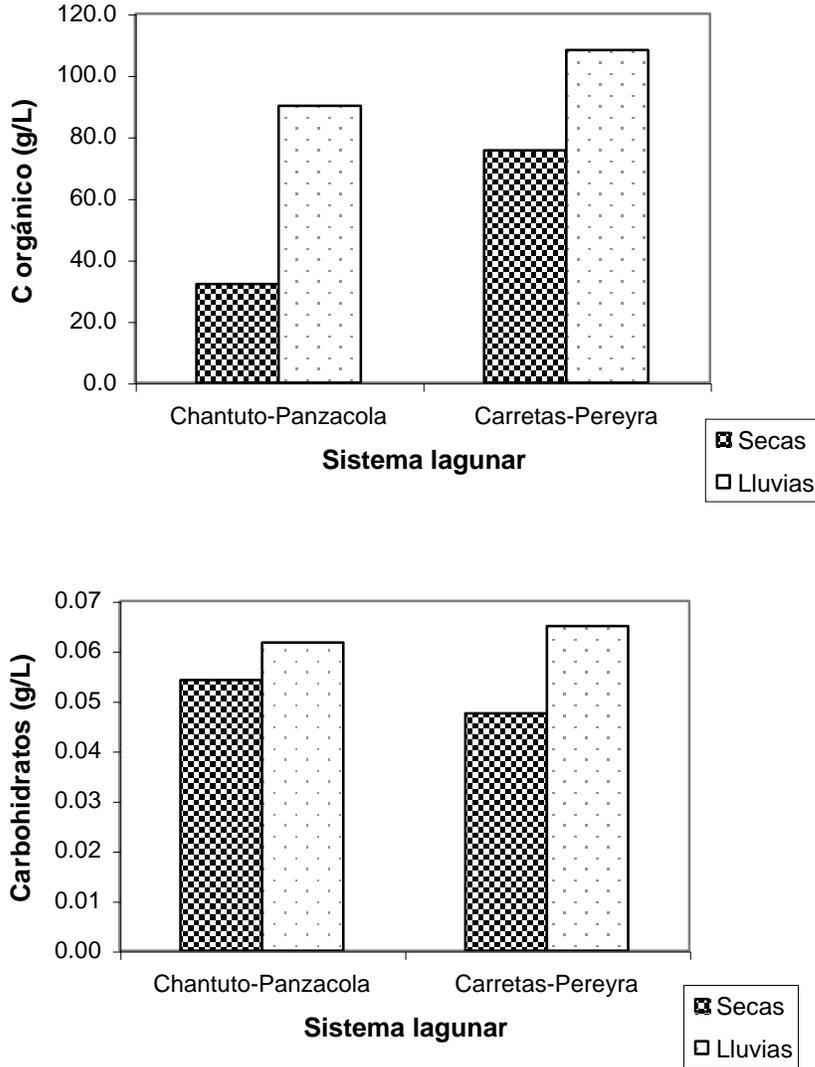


Figura 27. Variación temporal promedio de las fracciones orgánicas en el sedimento de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas, México.

Al-Ghadban *et al.* (1994) establecieron que diversos factores están implicados en la variación estacional de las formas orgánicas en zonas costeras, entre ellos destacan los aportes terrígenos y antropogénicos a partir de los ríos, la circulación del agua, el tamaño de grano de sedimento y la productividad biológica. Preston y Prodduturu

(1992), reportaron que los carbohidratos presentes en las zonas estuarino-lagunares son básicamente de origen alóctono y representan una fracción importante del carbono orgánico particulado que ingresa al sistema a través de los aportes fluviales.

Las concentraciones de carbono orgánico evaluadas en este estudio fueron superiores a las reportadas en otros sistemas costeros (Tabla 18). Al respecto Flores-Verdugo *et al.* (1985) mencionan que las lagunas costeras localizadas en climas húmedos de la costa oeste de México presentan un alto contenido de materia orgánica.

**Tabla 18. Porcentaje de carbono orgánico en sedimentos de diferentes ambientes costeros**

Carbono orgánico Promedio (%)	Sistema	Autor
1.03	Laguna Pueblo Viejo, Tamaulipas	Calva & Torres (2000)
1.32	Laguna Tamiahua, Veracruz	
1.59	Laguna Tampamachoco, Veracruz	
3.99	Laguna La Mancha, Veracruz	Rodríguez (1994)
1.5	Laguna Sontecomapan, Veracruz	Calva y Botello (1999)
1.27	Laguna Del Carmen, Tabasco	Rueda (1993)
4.85	Chantuto-Panzacola, Chiapas	Rueda <i>et al.</i> (1997)
6.61	Carretas-Pereyra, Chiapas	
2.51	Estuario Ashtamudi, India	Nair <i>et al.</i> (1983)
1.05	Estuario Goa, India	Algarsamy (1991)
1.61	Bahía Alejandría, Egipto	El-Sammak (1999)
18.0	Estuario Carolina del Norte, Estados Unidos	Brooks Avery <i>et al.</i> (2002)
10.0	Sedimentos del Mar Báltico	Boschker <i>et al.</i> (2001)

La concentración de las fracciones orgánicas presentes en el sedimento es un factor importante relacionado con la degradación anaeróbica de la materia orgánica, en la cual se requiere que existan una serie de relaciones entre una gran variedad de bacterias, desde los primeros pasos de rotura del carbono orgánico y sustancias poliméricas (como los carbohidratos), hasta la fermentación y la liberación de productos utilizables por las BSR y las AM. En el estrato de los 6-12 cm de profundidad en las lagunas de Campón y Pereyra, los restos fitoplanctónicos y de madera constituyeron una fuente orgánica importante para las bacterias anaerobias.

## **10.2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA**

### **ABUNDANCIA**

En los sedimentos de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra localizados en la costa del Pacífico Mexicano (Estado de Chiapas) se registraron abundancias relativamente elevadas de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica, en comparación con lo reportado para ambientes naturales de latitudes templadas (Tablas 19-20).

**Tabla 19. Abundancia de las bacterias sulfatorreductoras reportada en los sedimentos de diferentes ambientes acuáticos.**

Sustrato	Abundancia células/cm <sup>3</sup>	Ambiente	Autor
Lactato	1x10 <sup>6</sup> - 2x10 <sup>7</sup>	Sedimentos de una laguna costera mesomareal (Laguna Arcachon, Francia)	Schaub & Gemerden (1996)
	1x10 <sup>6</sup> - 6x10 <sup>7</sup>	Sedimentos de una laguna costera eutrófica (Laguna Etang du Prévost, Francia)	
	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	Sedimentos del fiordo Mariager	Teske <i>et al.</i> (1996)
	22x10 <sup>3</sup>	Sedimentos del estuario Ems-Dollard	Laanbroek & Pfennig (1981)
	1.3x10 <sup>5</sup>	Sedimentos del lago oligotrófico Stechlin	Sass <i>et al.</i> (1997)
	1.51x10 <sup>8</sup> - 1.59x10 <sup>10</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola, Chiapas.	Este estudio
	9.0x10 <sup>7</sup> - 5.13x10 <sup>9</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Carretas-Pereryra, Chiapas.	
Acetato	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sedimentos del fiordo Mariager	Teske <i>et al.</i> (1996)
	6x10 <sup>3</sup>	Sedimentos del estuario Ems-Dollard	Laanbroek & Pfennig (1981)
	6x10 <sup>3</sup>	Sedimentos del lago oligotrófico Stechlin	Sass <i>et al.</i> (1997)
	2.04x10 <sup>7</sup> - 1.46x10 <sup>9</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola, Chiapas.	Este estudio
	3.22x10 <sup>6</sup> - 1.51x10 <sup>9</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Carretas-Pereryra, Chiapas.	
Propionato	51x10 <sup>3</sup>	Sedimentos del estuario Ems-Dollard	Laanbroek & Pfennig (1981)
	8.02x10 <sup>5</sup> - 1.70x10 <sup>9</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola, Chiapas.	Este estudio
	2.61x10 <sup>6</sup> - 1.89x10 <sup>9</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Carretas-Pereryra, Chiapas.	

**Tabla 20. Abundancia de las arqueas metanogénicas reportada en los sedimentos de diferentes ambientes acuáticos.**

Sustrato	Abundancia células/cm <sup>3</sup>	Ambiente	Autor
Acetato	5.2x10 <sup>6</sup> 1.3 x 10 <sup>6</sup>	Sedimentos con <i>Spartina alterniflora</i> corta Sedimentos con <i>Spartina alterniflora</i> larga	Franklin <i>et al.</i> (1988)
	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sedimentos lacustres durante la circulación y estratificación de verano	Phelps & Zeikus (1985)
	12-250x10 <sup>5</sup>	Sedimentos lacustres	Cappenberg (1974)
	3.39x10 <sup>5</sup> - 2.53x10 <sup>7</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola, Chiapas.	Este estudio
	1.98x10 <sup>5</sup> - 2.09x10 <sup>7</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Carretas-Pereryra, Chiapas.	
Hidrógeno	6.9 x 10 <sup>6</sup> 0.98-2.0x10 <sup>6</sup>	Sedimentos con <i>Spartina alterniflora</i> corta Sedimentos con <i>Spartina alterniflora</i> larga	Franklin <i>et al.</i> (1988)
	4x10 <sup>6</sup> 2-4x10 <sup>5</sup>	Sedimentos con <i>Spartina alterniflora</i> corta Sedimentos con <i>Spartina alterniflora</i> larga	Jones & Paynter (1980)
	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	Sedimentos lacustres durante la circulación y estratificación de verano	Phelps & Zeikus (1985)
	1.66x10 <sup>5</sup> - 2.21x10 <sup>7</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola, Chiapas.	Este estudio
	1.64x10 <sup>5</sup> - 3.80x10 <sup>7</sup>	Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Carretas-Pereryra, Chiapas.	
	Metanol	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	Sedimentos lacustres durante la circulación y estratificación de verano
5-300 x 10 <sup>5</sup>		Sedimentos lacustres	Cappenberg (1974)
4.87x10 <sup>6</sup> - 2.06x10 <sup>8</sup>		Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola, Chiapas.	Este estudio
2.38x10 <sup>6</sup> - 6.11x10 <sup>7</sup>		Sedimentos de las lagunas costeras del sistema Carretas-Pereryra, Chiapas.	

Se ha demostrado que la sulfatorreducción y la producción de metano son procesos dependientes de las condiciones ambientales, como la temperatura, pH, Eh y contenido de materia orgánica (Segers, 1988). En el presente trabajo el desarrollo de las BSR y de las AM fue favorecido por los valores de temperatura, pH y Eh evaluados en los sedimentos lagunares, así como por el contenido de carbono orgánico y de carbohidratos, que en conjunto contribuyeron a las altas densidades evaluadas.

Con base en los resultados de temperatura obtenidos, podría considerarse que las BSR y las AM en los sedimentos de las lagunas estudiadas se desarrollaron en condiciones mesofílicas. Sagemann *et al.* (1998) determinaron que las temperaturas óptimas para la sulfatorreducción son de 25-30°C, mientras que en los humedales localizados en regiones tropicales la temperatura óptima para el desarrollo de la microbiota metanogénica es de 30-32°C (Neue *et al.*, 1997)

Las condiciones de pH evaluadas en el sedimento de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, contribuyeron al desarrollo de las poblaciones de las BSR y las AM, ya que la mayoría de las poblaciones de estos grupos microbianos tienen un intervalo óptimo de pH para su crecimiento entre 6 y 8 (Vogels *et al.*, 1988; Widdel, 1988). Gunnarsson y Rönnow (1992) reportaron la presencia de BSR y AM en sedimentos costeros con pH de 7.1-7.5, mientras que Mohanraju *et al.* (1997) asociaron la presencia de AM con pH de 6.6-7.2 en sedimentos estuarinos asociados a la presencia de manglares. Aunque la mayoría de las BSR y de las AM se

desarrollan en un intervalo de pH cercano a la neutralidad (6.5-7.5) y rara vez se desarrollan a un pH inferior a 6.0 o superior a 8.0 (García, 1990), se ha reportado la presencia de especies acidofílicas, es decir, que presentan un crecimiento óptimo a un pH entre 4 y 5.

A partir de los intervalos de Eh evaluados, las características del sedimento fueron de moderadamente reducidas (+100 a +200 mV), a reducidas (-100 a +100 mV) y finalmente altamente reducidas (-300 a -100 mV) (Patrick *et al.*, 1996). La presencia de estas condiciones de óxido-reducción favorecieron el desarrollo de la microbiota anaerobia cuantificada en este estudio. La presencia de las BSR se ha reportado desde potenciales redox de -115 hasta -450 mV, aunque aparentemente la sulfatorreducción domina en potenciales de oxido-reducción entre -150 y -300 mV (Patrick & Jugsujinda, 1995), mientras que las AM abundan en Eh inferiores a -220 mV (Cappenberg, 1974).

Las BSR y las AM son abundantes en ambientes con altos contenidos de carbono orgánico, por lo cual su actividad puede estar limitada tanto por la cantidad como por la disponibilidad del mismo. En las lagunas estudiadas el crecimiento de las BSR y de las AM pudo verse favorecido por la alta concentración de las fracciones orgánicas determinada, principalmente del carbono orgánico (Tabla 18), así como a su aporte continuo a través de las descargas fluviales y a la presencia de una reserva de material refractario que quedó depositado después de la tormenta tropical “Javier” sucedida en el año de 1998 (Márquez García *et al.*, 2006). El material

refractario localizado principalmente en el estrato de los 6-12 cm de profundidad del sedimento de las lagunas de Pereyra y Campón, estuvo compuesto de restos de madera y fitoplancton, cuya degradación ha sido muy lenta.

Los carbohidratos sencillos, los aminoácidos y los ácidos carboxílicos de cadena corta son las fracciones orgánicas que se descomponen más fácilmente, en cuestión de horas o semanas. Por el contrario los compuestos con un alto grado de polimerización son difíciles de descomponer. Un compuesto típico que contiene muchas características recalcitrantes es la lignina. La lignina se degrada lentamente bajo condiciones anaerobias, por lo cual la velocidad del metabolismo anaerobio es lenta y el contenido de sólidos volátiles es alto, pudiendo llegar a representar hasta el 80% del peso seco de los sedimentos (Hedges *et al.*, 2002; Canfield *et al.*, 2005a).

La alta densidad de BSR y AM cuantificada también puede atribuirse al hecho de que diversos géneros de ambos grupos microbianos pueden no tener especificidad por un solo sustrato, sino que pueden utilizar dos o más donadores de electrones diferentes, por lo que podría haberse presentado un traslape de géneros entre los sustratos analizados. Por ejemplo *Desulfotomaculum* oxida de manera incompleta el lactato, pero también puede metabolizar el hidrógeno. *Desulfovibrio* efectúa la oxidación incompleta del propionato, sin embargo fermenta el lactato cuando disminuye el contenido de sulfatos en el medio. Boschker *et al.* (2001) mencionan que algunas especies de BSR que emplean propionato también son capaces de usar el acetato, por lo que es posible que el acetato y el propionato sean consumidos por

la misma población de BSR en los sedimentos anóxicos. Por lo que se refiere a las AM, *Methanosarcina* crece preferentemente a partir de acetato, pero puede utilizar hidrógeno y metanol (Vogels *et al.*, 1988; Kotsyurbenko *et al.*, 2004).

## **DISTRIBUCIÓN TEMPORAL**

### **Bacterias sulfatorreductoras**

Se investigó la abundancia de las bacterias sulfatorreductoras (BSR) usando diferentes donadores de electrones, los cuales son utilizados comúnmente como sustratos (i. e. lactato, acetato, hidrógeno y propionato) (Gibson, 1990; Canfield *et al.*, 2005b).

Con base en los resultados obtenidos en los sedimentos de los sistemas lagunares Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, se determinó una variación estacional significativa de la abundancia de las BSR con los cuatro sustratos analizados (Tabla 15). En la temporada de secas fueron más abundantes, mientras que en los meses de lluvias su densidad disminuyó entre dos y cuatro ordenes de magnitud, es decir, entre cien y diez mil veces con respecto a las cuantificaciones registradas en los meses de secas (Figs. 28-29).

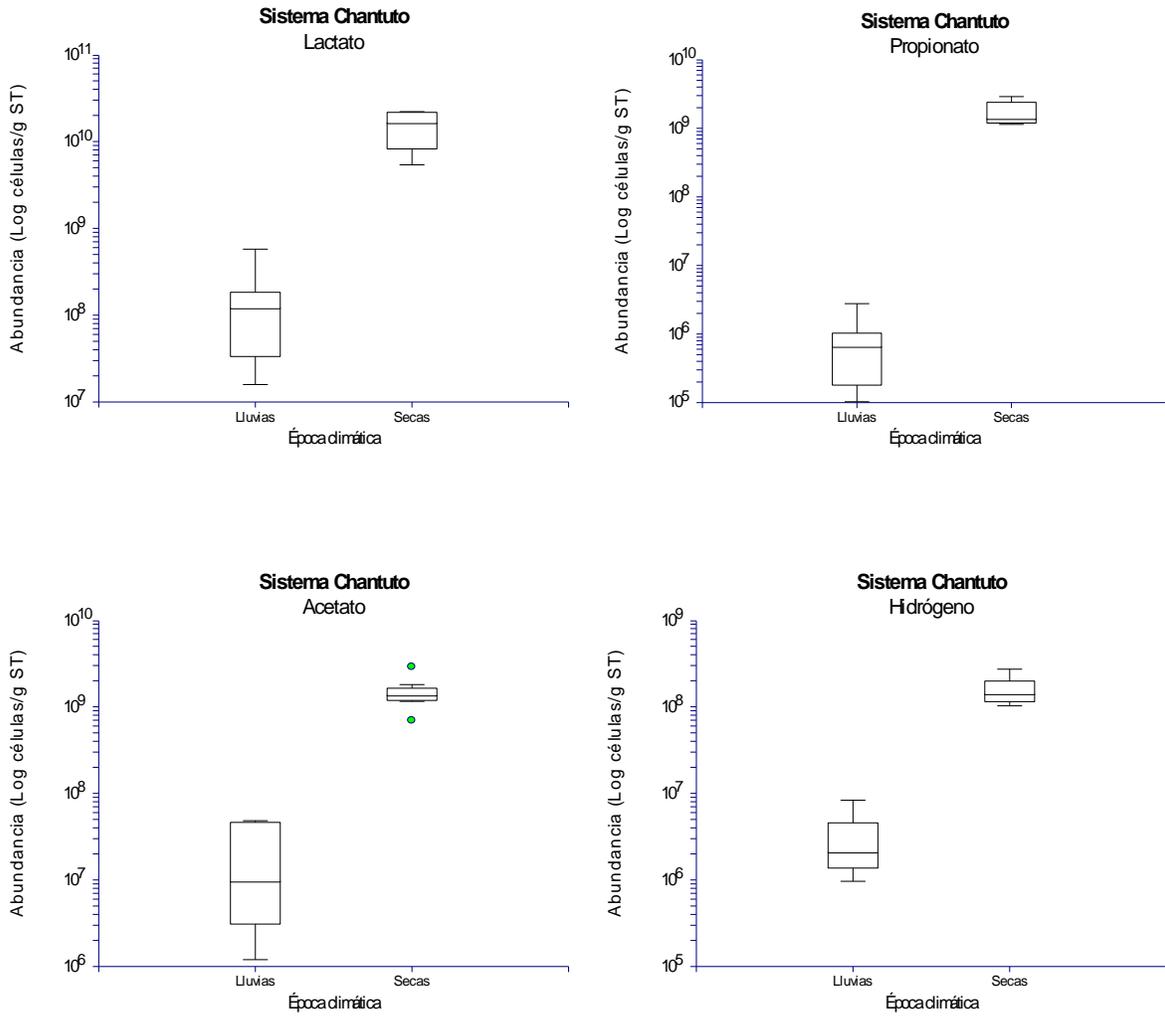


Figura 28. Variación temporal de la abundancia de las bacterias sulfatorreductoras, a partir de diferentes sustratos, en los sedimentos del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

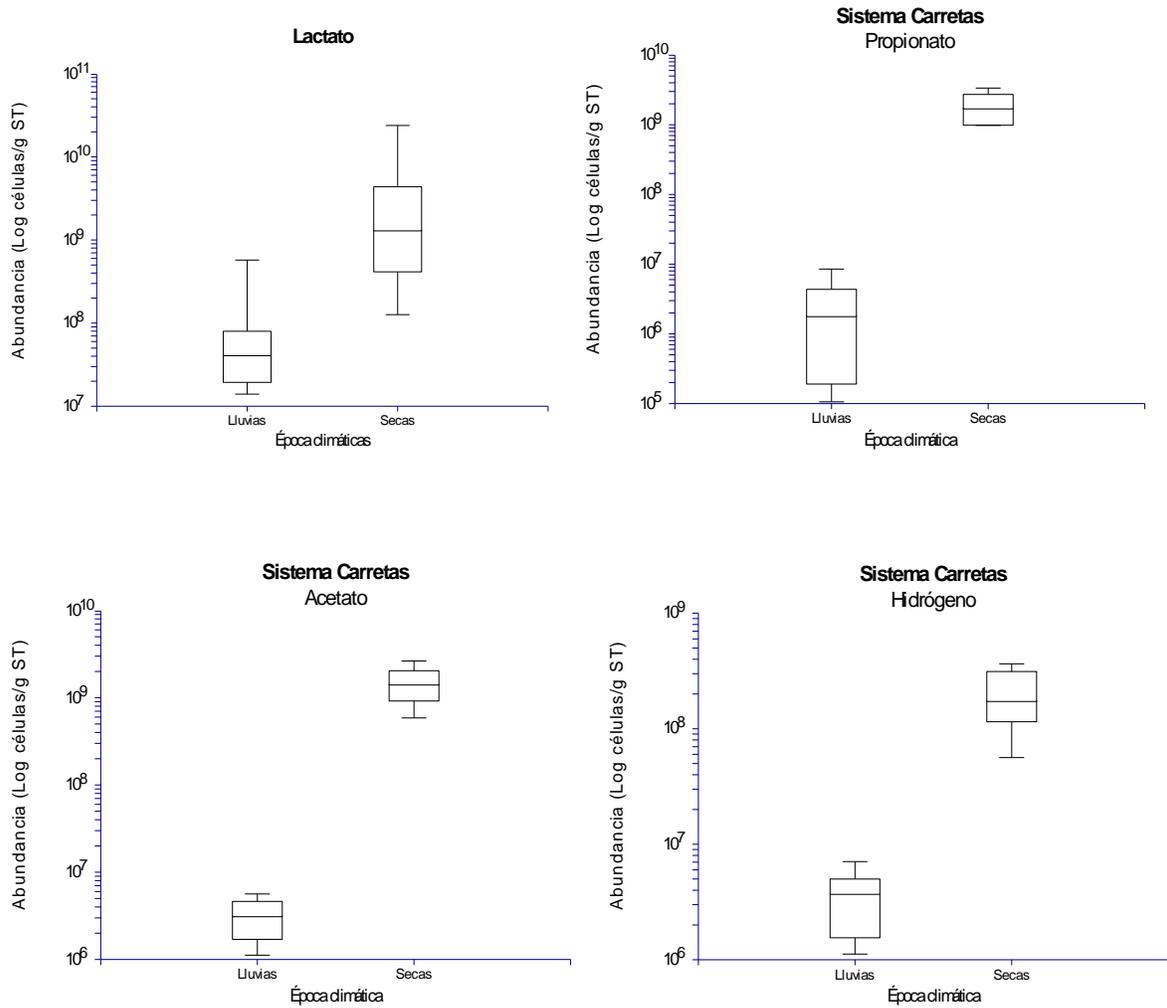


Figura 29. Variación temporal de la abundancia de las bacterias sulfatorreductoras, a partir de diferentes sustratos, en los sedimentos del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

A partir del análisis de correlación de Spearman (Tabla 15), en la época de secas diversas variables ambientales contribuyeron a favorecer el desarrollo de las BSR, entre éstas sobresalieron la temperatura, salinidad y contenido de sulfatos. En los meses de febrero, mayo y junio, al aumentar la temperatura hubo un mayor crecimiento de las poblaciones sulfatorreductoras, determinándose una correlación significativa directa entre las abundancias de las BSR con la temperatura. Canfield *et al.* (2005b) atribuyen esta correlación a la respuesta de un incremento de la actividad metabólica de las BSR al aumentar la temperatura.

Las BSR son microorganismos de hábitats preferentemente marinos, los cuales están definidos por sus características de salinidad. La salinidad es una propiedad del agua de mar que depende de la concentración de diversos iones, siendo el sodio, los cloruros y los sulfatos los más abundantes, mientras que los ioduros, bromuros y carbonatos están en menor proporción (Thurman, 1997; Pinet, 2003). La presencia de BSR se ha reportado generalmente en ambientes con una concentración de NaCl del 28%, y en algunos casos en salinidades extremas (Brandt *et al.*, 2001; Sørensen & Canfield, 2004).

Los sulfatos son particularmente importantes para las BSR, ya que actúan como el aceptor final de electrones durante la mineralización anaerobia de la materia orgánica; por lo tanto, su presencia es un requisito indispensable para que exista la sulfatorreducción. Aunque las BSR abundan en aquellos ambientes caracterizados por la presencia de sulfatos, también se han reportado en sedimentos lacustres

(Sass *et al.*, 1997).

Con respecto a la abundancia por sustrato, con el lactato se registró la mayor abundancia en ambas épocas climáticas en los dos sistemas. El propionato fue un sustrato importante en los meses de secas, pero su contribución a la abundancia de las BSR disminuyó en las lluvias, cuando fue desplazado por el acetato. Con el hidrógeno se cuantificó la menor densidad de BSR (Figs. 30-31).

El lactato es un donador de electrones importante para la mayoría de las especies de BSR, con excepción del género *Desulfobacter* y algunas especies del género *Desulfobacterium* (Castro *et al.*, 2002). Laanbroek y Pfennig (1981) determinaron que *Desulfovibrio desulfuricans* oxida completamente el lactato hasta CO<sub>2</sub> en medios marinos, asimismo Cappenberg (1974, 1975), Miller *et al.*, (1979) y Parkes *et al.*, (1989) puntualizan que el lactato es el principal sustrato en sedimentos que muestran un enriquecimiento con materia orgánica y en superficies limosas expuestas temporalmente. En sedimentos limosos marinos se ha reportado que algunas especies del género *Desulfococcus* pueden fermentarlo (Widdel & Hansen, 1992). Cappenberg y Prins (1974) sugieren que éste es el principal sustrato para la sulfatorreducción en sedimentos de lagos.

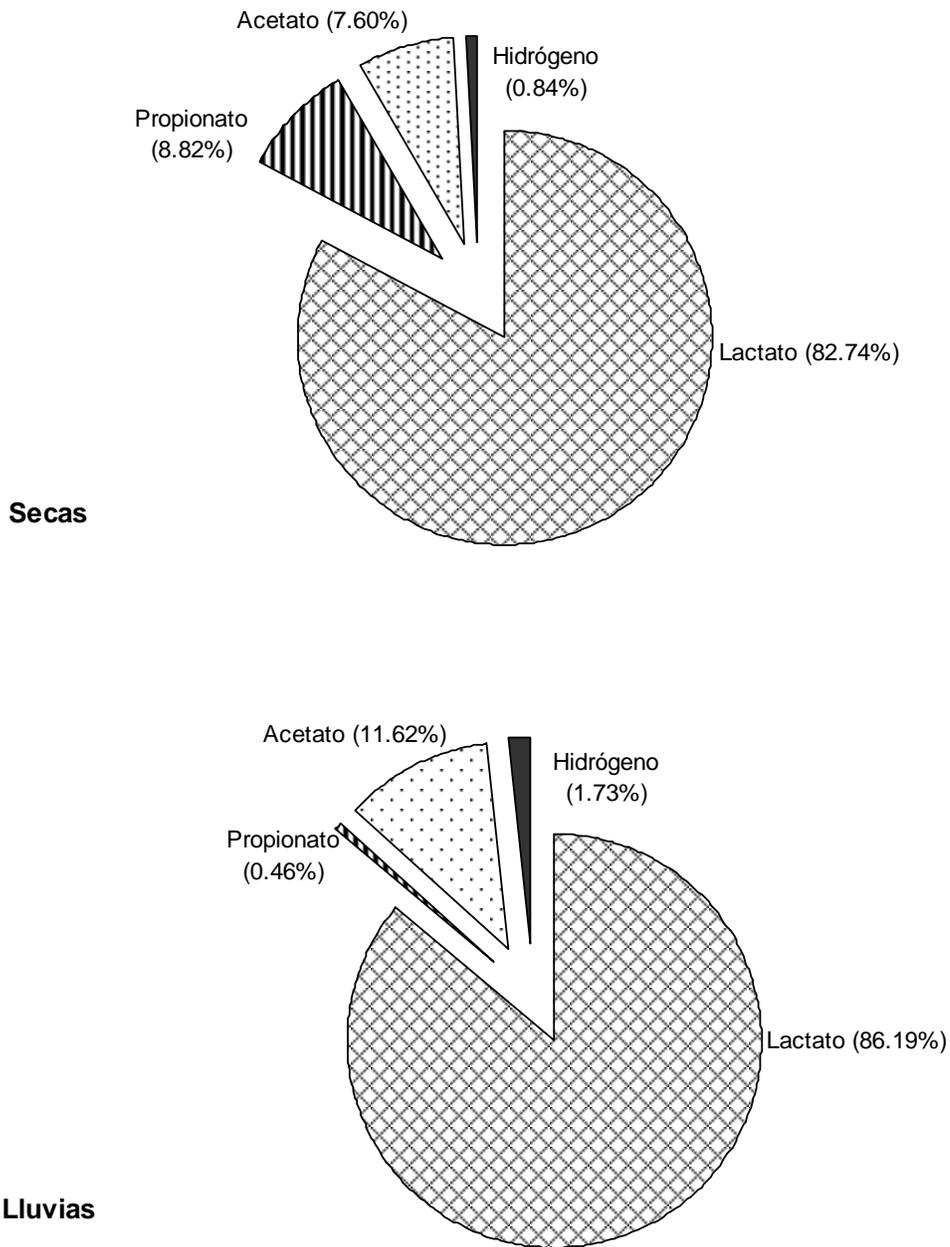
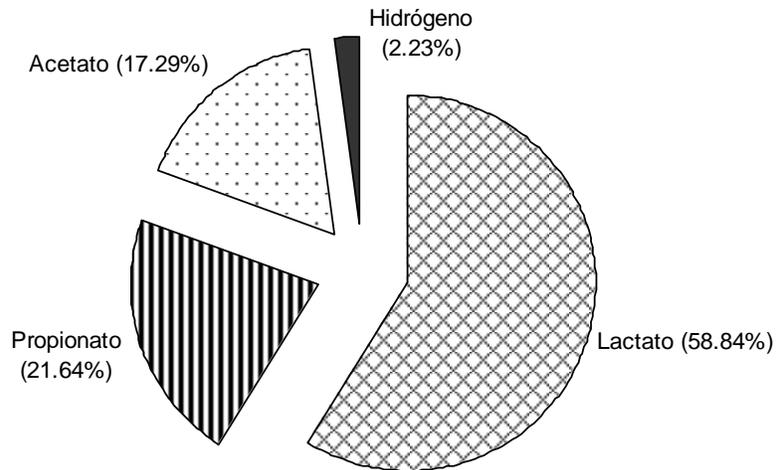
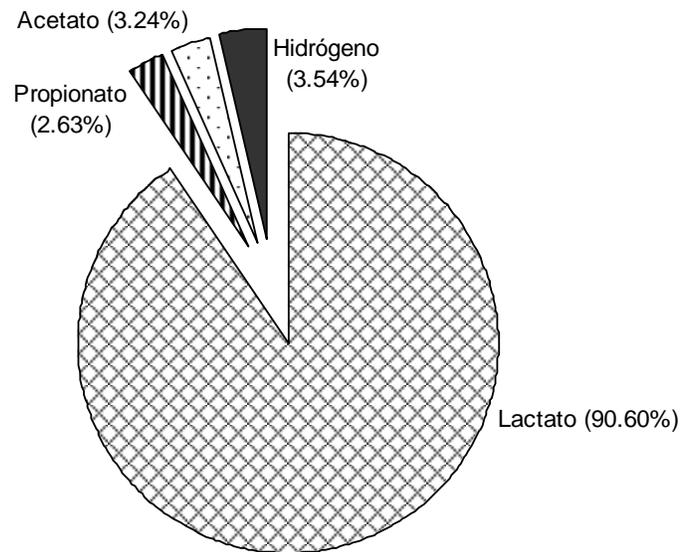


Figura 30. Contribución de los diferentes sustratos a la abundancia de las bacterias sulfatorreductoras en el sedimento del sistema lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).



**Secas**



**Lluvias**

Figura 31. Contribución de los diferentes sustratos a la abundancia de las bacterias sulfatorreductoras en el sedimento del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

El propionato es un producto común de diversas fermentaciones y se ha identificado que algunas especies del género *Desulfobulbus* pueden oxidar de manera incompleta este ácido graso, liberando acetato y CO<sub>2</sub> (Laanbroek & Pfennig, 1981; Widdel & Hansen, 1992; Vance & Brink, 1994). En sedimentos de marismas, dichas bacterias metabolizan directamente el propionato, el butirato y el L-lactato en presencia de sulfatos. Al parecer la presencia de sulfatos constituye un requisito para el consumo del propionato vía sulfatorreducción. En estudios efectuados durante el tratamiento anaerobio (reactores UASB) de aguas de desecho con exceso de sulfatos se ha demostrado que las BSR pueden competir con las bacterias acetoclásticas por el propionato, sin embargo a bajas concentraciones de sulfatos la degradación de los ácidos grasos volátiles se lleva a cabo principalmente por una asociación sintrófica entre las bacterias acetoclásticas y las metanogénicas (Visser *et al.*, 1993). Esta relación se observó también en ambientes dulceacuícolas (Banat & Nedwell, 1983).

En pruebas de actividad cinética utilizando sedimentos marinos y molibdato como inhibidor de la sulfatorreducción, se presentó una acumulación de propionato y butirato en los mismos, corroborando entonces que estos ácidos grasos son substratos importantes para la sulfatorreducción en hábitats marinos (Banat & Nedwell, 1983; Dicker & Smith, 1985). Visser *et al.* (1993) reportaron que en presencia de sulfatos la actividad de las BSR es elevada, produciéndose aproximadamente 0.75 mol de ácido sulfhídrico por cada mol de propionato degradado. Por tanto, en concentraciones elevadas de sulfatos la oxidación del

propionato es más importante. También las BSR que emplean propionato y acetato son el grupo fisiológico numéricamente dominante en ambientes productores de petróleo, además son activas en la degradación del abono de letrinas donde eliminan los ácidos grasos volátiles (Sai Ram *et al.*, 1993). Por tanto en presencia de sulfatos, la oxidación del propionato por las BSR es un mecanismo importante en la mineralización del carbono.

El grupo fisiológico de las BSR que utilizan acetato puede incluir representantes de los géneros *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfurella* y *Desulfuromonas* (Widdel, 1988; Holt *et al.*, 1994); otras BSR que emplean acetato se han identificado comúnmente en sedimentos costeros e incluyen representantes de los géneros *Desulfosarcina*, *Desulforhabdus* y la especie *Desulfotomaculum acetoxidans* (Gray & Herwig, 1996; Sahm *et al.*, 1999; Boschker *et al.*, 2001).

Parkes *et al.* (1989) efectuaron un estudio de las tasas de sulfatorreducción en sedimentos marinos y estuarinos, reportando que en éstos el acetato representa del 35% al 100% de la sulfatorreducción total, el propionato del 6% al 12%, y juntos constituyen el 80% de la misma, mientras que el lactato es el responsable del 43%.

### **Arqueas metanogénicas.**

Los patrones de distribución de las AM, el número de éstas, así como los parámetros físicos, químicos y nutricionales que gobiernan su abundancia y distribución han sido evaluados principalmente en sedimentos lacustres y de humedales dulceacuícolas

(Zeep Falz *et al.*, 1999; Kotsyurbenko *et al.*, 2004) y en menor proporción en humedales salobres (marismas) caracterizados por la presencia de *Spartina alterniflora* (Jones & Paynter, 1980; Franklin *et al.*, 1988) y en sedimentos de zonas estuarino-lagunares asociadas a manglares (Mohanraju *et al.*, 1997). A pesar de que las AM son abundantes en ambientes dulceacuícolas, Kadam *et al.* (1989) reportaron su presencia en sedimentos marinos tropicales con salinidades de 30-40 ups.

La cuantificación de las arqueas metanogénicas (AM) se llevó a cabo con los tres sustratos comúnmente empleados por éstas (acetato, hidrógeno y metanol) (Kadam *et al.*, 1989). Las densidades de los tres grupos nutricionales fueron más abundantes en los meses asociados a las lluvias, disminuyendo su densidad en la temporada de secas en dos ordenes de magnitud, es decir en cien veces con respecto a las cuantificaciones de lluvias (Figs. 32-33). Como en el caso de las BSR, los cambios temporales en la densidad de las AM se relacionaron significativamente de manera inversa con las variables ambientales en el sedimento y agua intersticial, principalmente la salinidad y la concentración de sulfatos (Tabla 15).

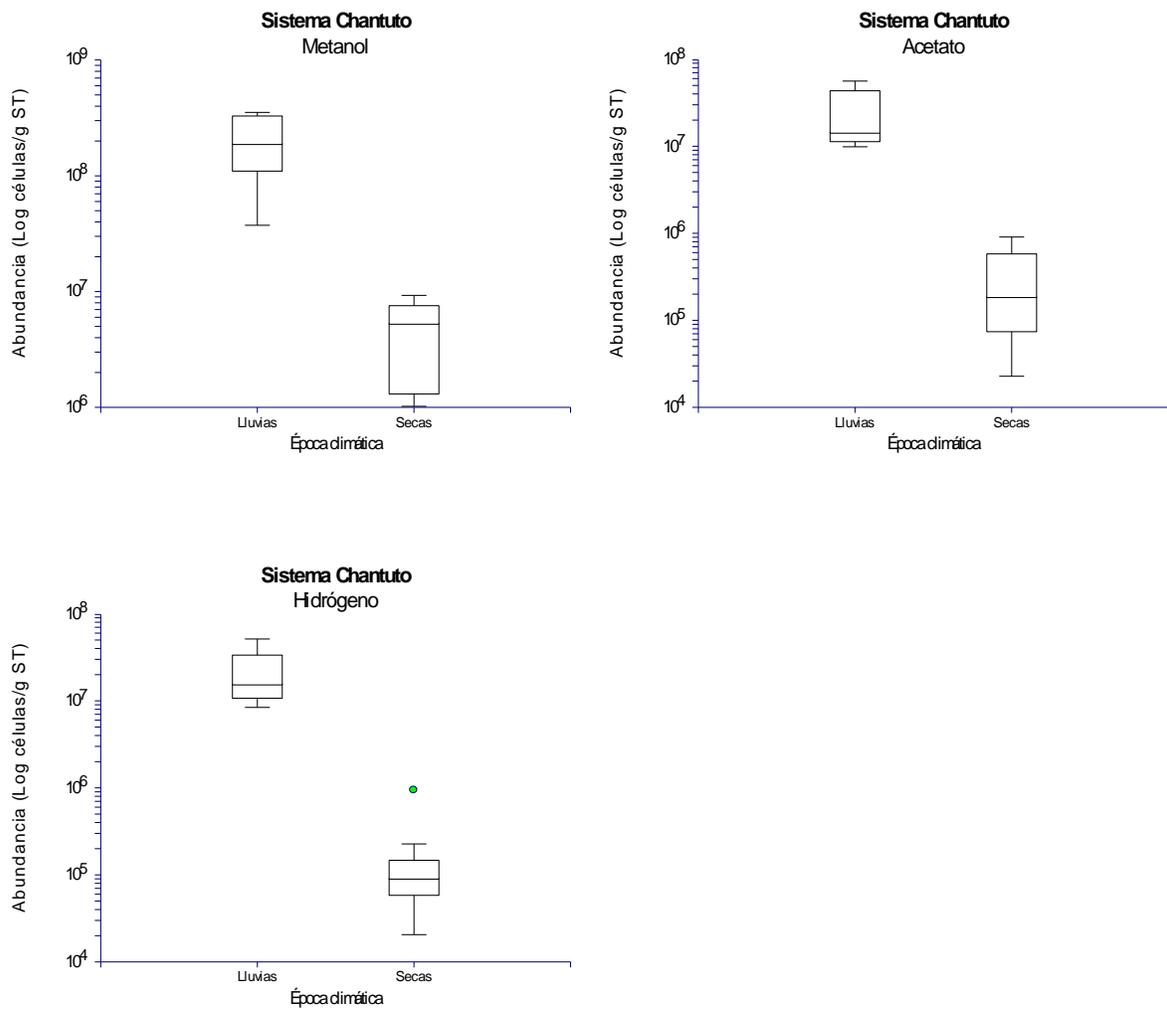


Figura 32. Variación estacional de la abundancia de las arqueas metanogénicas, a partir de diferentes sustratos, en los sedimentos del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

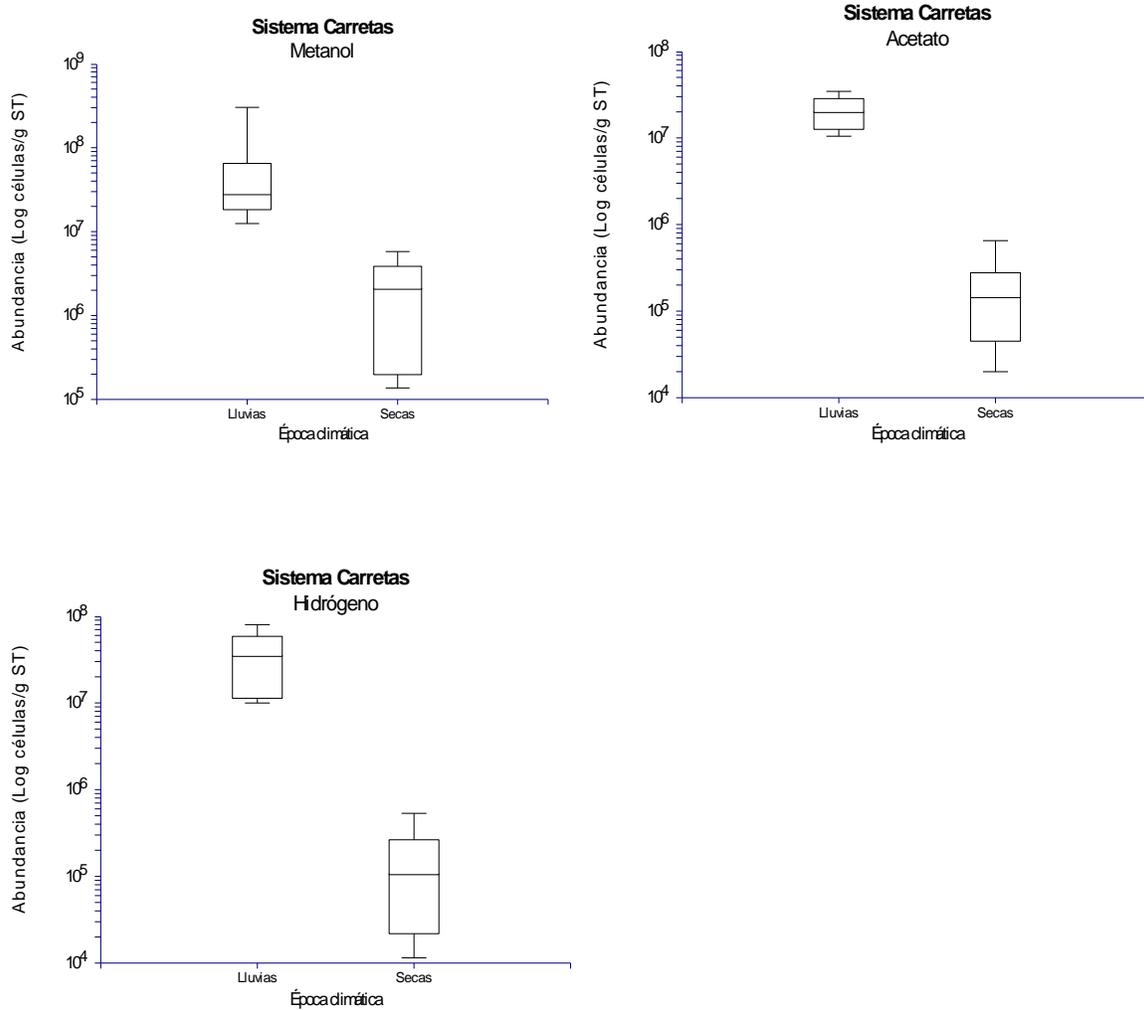


Figura 33. Variación estacional de la abundancia de las arqueas metanogénicas, a partir de diferentes sustratos, en los sedimentos del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

Las AM abundan en aquellos ambientes anóxicos donde los aceptores de electrones como nitratos y sulfatos no están presentes o se encuentran en bajas concentraciones, por lo cual estos microorganismos son abundantes en ambientes dulceacuícolas caracterizados por una abundancia de cloruro de sodio inferior a los 3 g/L. Este comportamiento se debe a que las AM tienen una baja producción de energía, en comparación con los otros tipos de metabolismo anaerobio, lo que las dificulta para competir por los donadores de electrones disponibles (hidrógeno y acetato) cuando otras poblaciones anaerobias están activas (Canfield *et al.*, 2005a). Lo anterior determinó que en el presente estudio las AM alcanzaran mayor densidad en los meses de julio, octubre y noviembre (asociados a la presencia de lluvias), ya que la entrada de agua dulce a las lagunas contribuyó a disminuir la salinidad y la concentración de sulfatos en el agua intersticial, determinándose correlaciones significativas inversas entre los tres grupos nutricionales de las AM con dichas variables ambientales (Tabla 15).

A diferencia de las BSR, no se determinó un cambio en la abundancia de las AM con base en el sustrato en las diferentes épocas climáticas; tanto en los meses de secas como de lluvias el sustrato preferido fue el metanol seguido por el acetato. Al parecer el hidrógeno es el donador de menor importancia en estos sistemas (Figs. 34-35).

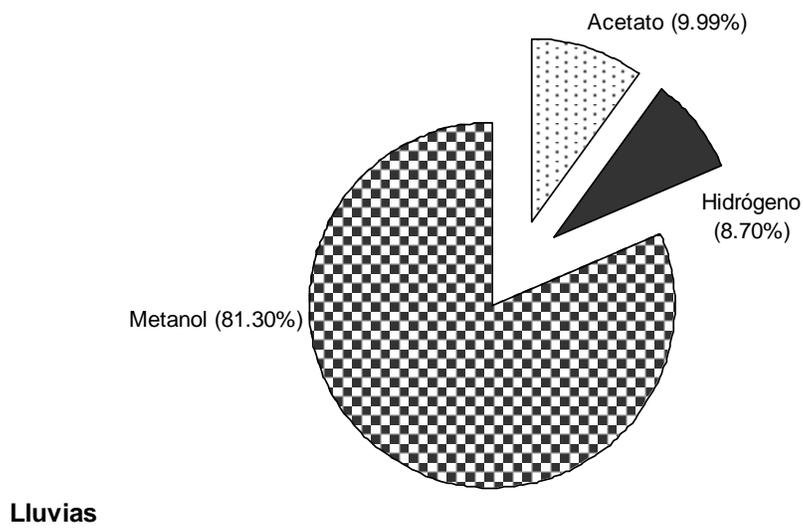
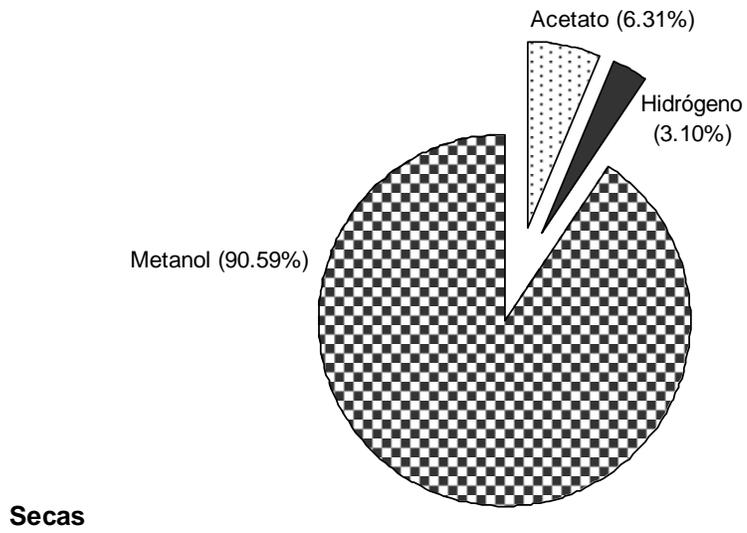


Figura 34. Contribución de los diferentes sustratos a la abundancia de las arqueas metanogénicas en el sedimento del sistema lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

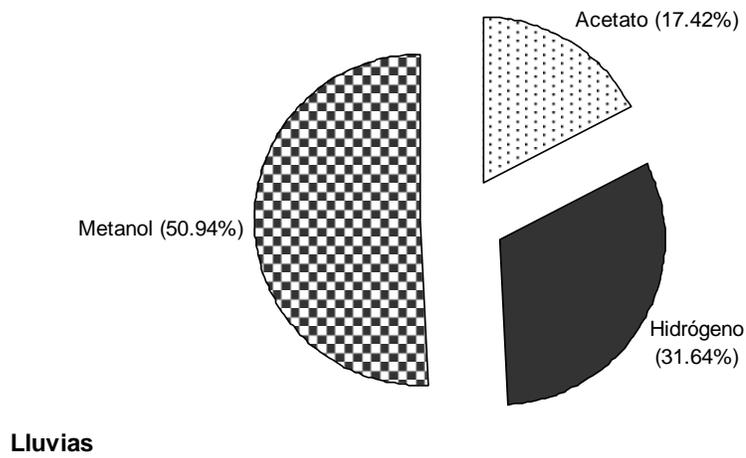
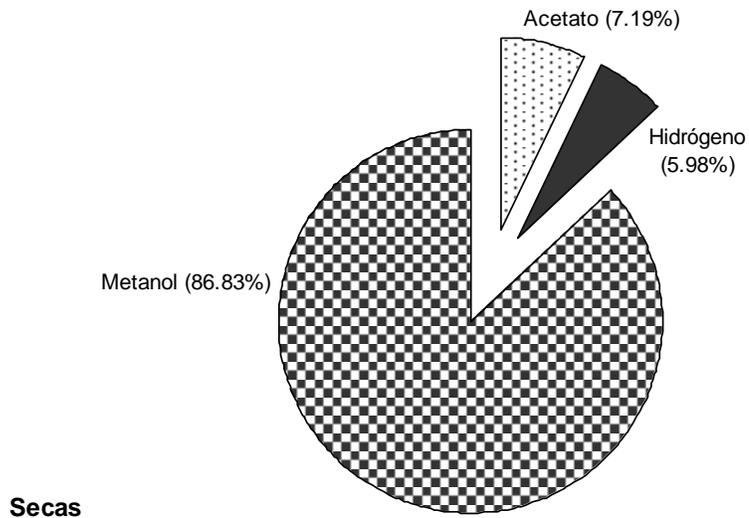


Figura 35. Contribución de los diferentes sustratos a la abundancia de las arqueas metanogénicas en el sedimento del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

El metanol se origina de la rotura de compuestos metilados como la pectina y las ligninas (Schink & Zeikus, 1980), se conocen once especies de AM capaces de utilizarlo pertenecientes a los géneros: *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanohalophilus*, *Methanococcoides* y *Methanolobus* (Lovley & Ferry, 1985; Vogels *et al.*, 1988; Canfield *et al.*, 2005a). Mathrani y Boone (1985) reportaron que en los sedimentos donde el sulfato no es limitante, las BSR pueden competir efectivamente con las AM principalmente por el acetato y el hidrógeno disponibles, por lo cual en estos ambientes las metilaminas y el metanol llegan a representar los principales substratos para las AM. Yancey *et al.* (1982), Winfrey y Ward (1983) y Oren (1988) establecieron que el metanol y las metilaminas son substratos más especializados que sirven como precursores del metano en medios con un alto contenido de sales. Lovley y Klug (1983) encontraron que la formación de metano a partir de metanol puede representar del 2.8-4.0% de la producción total de metano y contribuye a que las AM mantengan sus poblaciones cuando hay suministro de sulfatos al medio.

El acetato, producto final de diversas rutas metabólicas, genera aproximadamente dos terceras partes del metano; se conocen siete géneros capaces de utilizar el acetato y éstos son: *Methanosarcina*, *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*, *Methanothrix* y los miembros filamentosos del género *Methanosaeta* (Holt *et al.*, 1994; Canfield *et al.*, 2005a). Este ácido graso puede representar del 70 al 90% del metano formado en sedimentos lacustres, lodos de desecho y humedales artificiales (campos arroceros) (Sandbeck & Ward, 1981).

No obstante lo anterior, se ha reportado que la contribución del acetato para la formación de metano disminuye por debajo del 67% cuando éste es consumido por otros procesos anaerobios (Avery *et al.*, 1999; Kotsyurbenko *et al.*, 2004).

El hidrógeno puede ser utilizado para reducir el CO<sub>2</sub> por especies de los géneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanogenium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina* y *Methanoplanus* (Olliver *et al.*, 1986; Vogels *et al.*, 1988; Canfield *et al.*, 2005a). Conrad (1999) reporta que teóricamente el hidrógeno contribuye con el 33% de la metanogénesis total cuando los carbohidratos o formas similares de materia orgánica son degradados. En ambientes con altas tasas de sedimentación y enriquecimiento de carbono orgánico, se ha demostrado que la actividad de las AM hidrogenofílicas puede ser favorecida, lo que provoca que las que crecen a partir de acetato sean desplazadas (Zeep Falz *et al.*, 1999). Aunado a lo anterior, aparentemente con bajas concentraciones de sulfatos, el hidrógeno es el donador de electrones más importante para la metanogénesis (Canfield *et al.*, 2005a).

#### **DISTRIBUCIÓN ESPACIAL.**

En el presente estudio en ambas profundidades analizadas (0-6 cm y 6-12 cm) se presentaron las BSR y las AM. Estos resultados del número de bacterias con respecto a la profundidad indican que los procesos de metanogénesis y sulfatorreducción pueden existir conjuntamente, como ha sido estipulado previamente por Gunnarsson y Rönnow (1982), quienes reportaron la presencia tanto

de BSR como de AM a todo lo largo de la columna sedimentaria; asimismo Ramamurthy *et al.* (1990), concluyeron que la metanogénesis y la sulfatorreducción se pueden presentar simultáneamente en un mismo estrato del sedimento, siempre y cuando exista un aporte adecuado de sustratos no competitivos (metanol y metilaminas) o que los sustratos competitivos sean abundantes (acetato,  $H_2-CO_2$ ). No obstante lo anterior, hay que señalar que existieron diferencias en cuanto a los estratos sedimentarios en los que se registró la máxima abundancia de cada grupo microbiano.

Las BSR aparentemente fueron más abundantes en el estrato superior del sedimento (0-6 cm) (Figs. 36-39). En diversas investigaciones se ha mencionado que la densidad de la microbiota sulfatorreductora desciende conforme se incrementa la profundidad sedimentaria. La razón para este comportamiento parece obedecer a la disponibilidad del aceptor de electrones y a una competencia por los sustratos comunes entre las BSR y las AM (Risatti *et al.*, 1994; Sass *et al.*, 1997a). Como existe suficiente sulfato en los primeros centímetros del sedimento, las BSR metabolizan los principales productos resultantes de la fermentación y dominan. A una mayor profundidad la cantidad de sulfato disponible disminuye, limitando el crecimiento de las BSR. Debido a lo anterior, la máxima actividad sulfatorreductora se localiza en los primeros centímetros del sedimento (Nedwell & Abram, 1978; Winfrey & Ward, 1983; Howarth & Merkel, 1984).

La distribución anterior de las BSR también se ha reportado en sedimentos lacustres por Fukui y Takii (1996), quienes en un lago hipereutrófico cuantificaron la mayor abundancia de las BSR en los primeros centímetros del sedimento, dominando las que utilizan lactato, seguidas por las que emplean propionato y acetato.

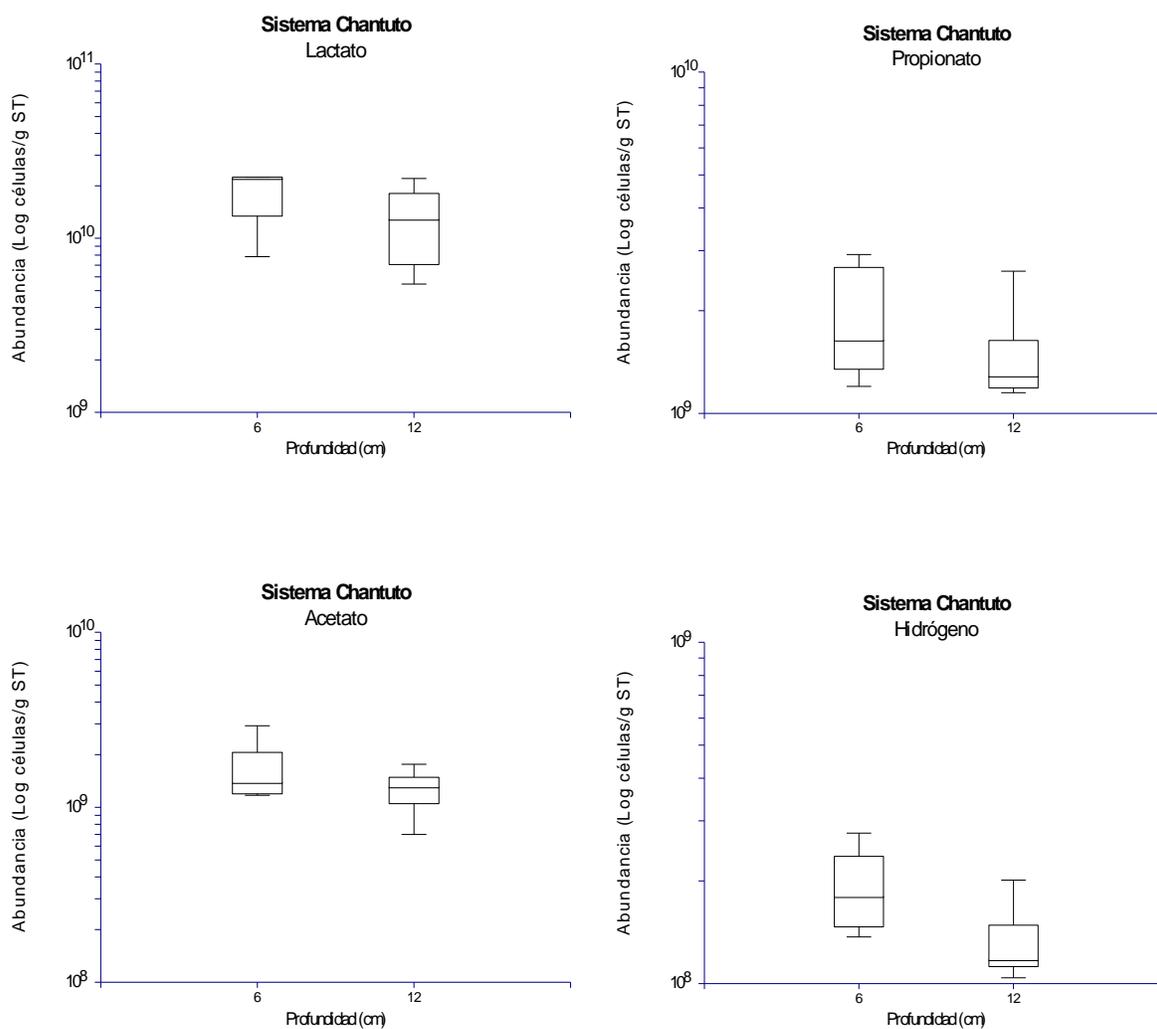


Figura 36. Distribución vertical de las bacterias sulfatorreductoras, durante la época de secas, en el sedimento de las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

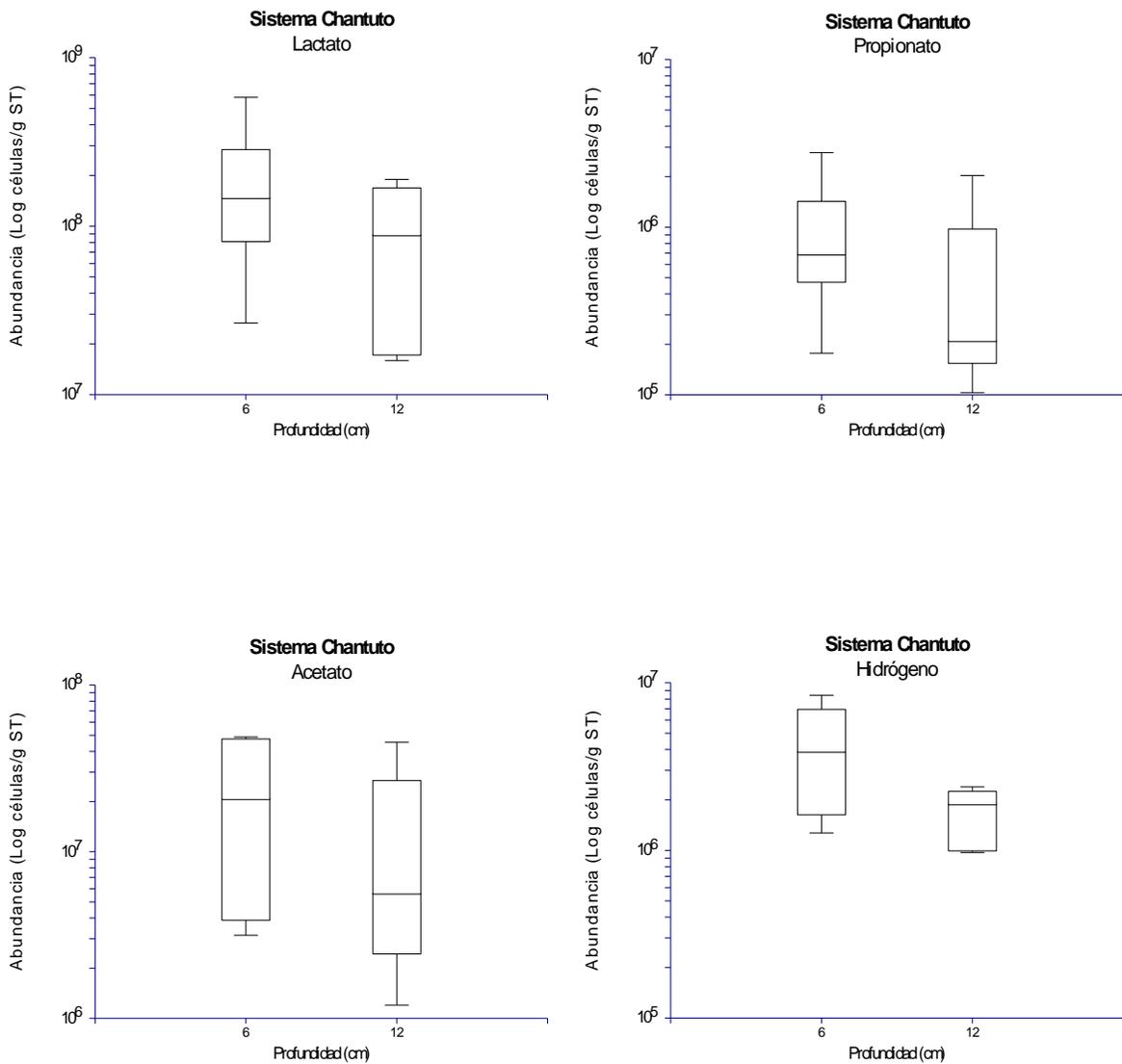


Figura 37. Distribución vertical de las bacterias sulfatorreductoras, durante la época de lluvias, en el sedimento de las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

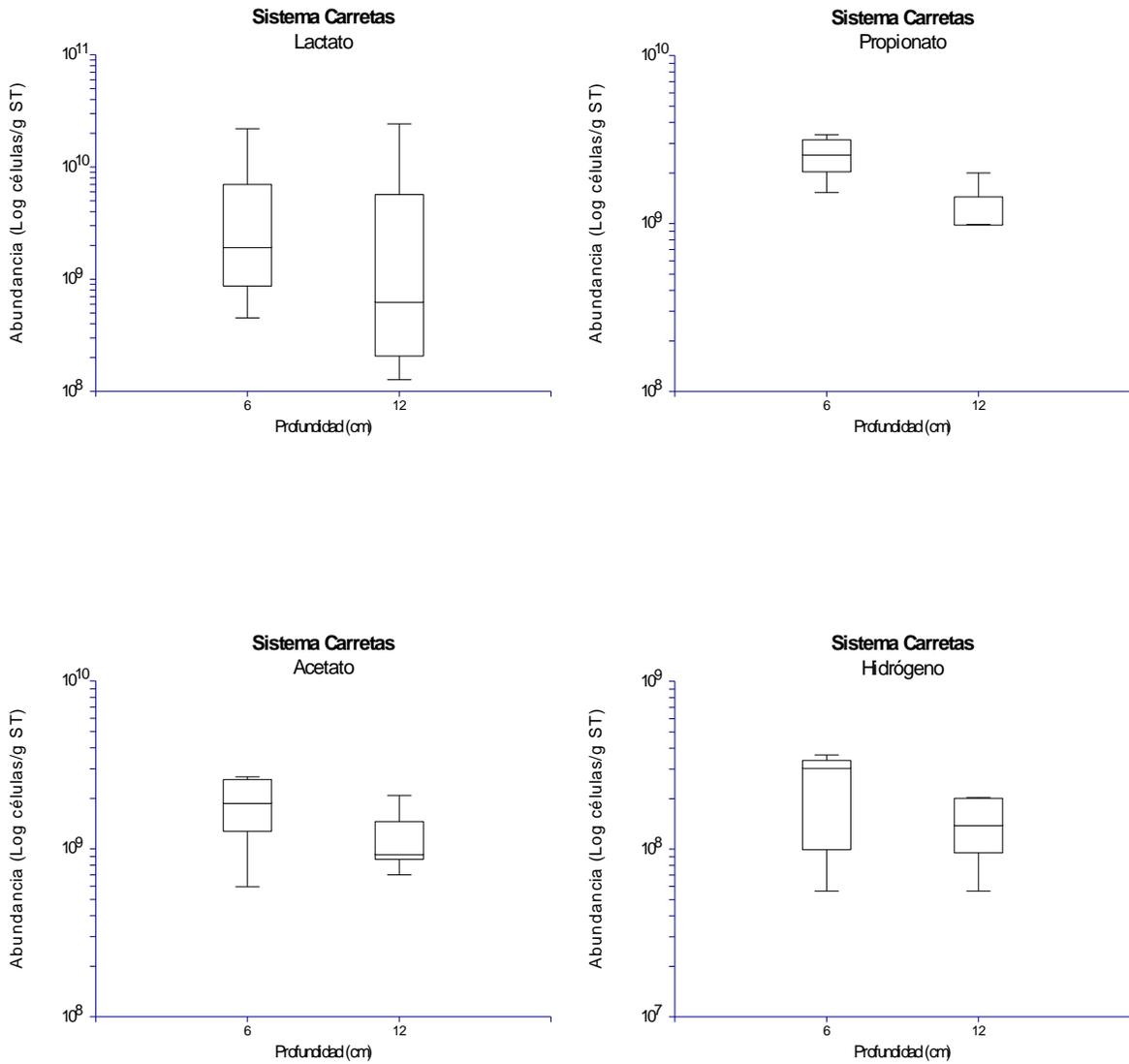


Figura 38. Distribución vertical de las bacterias sulfatorreductoras, durante la época de secas, en el sedimento de las lagunas del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

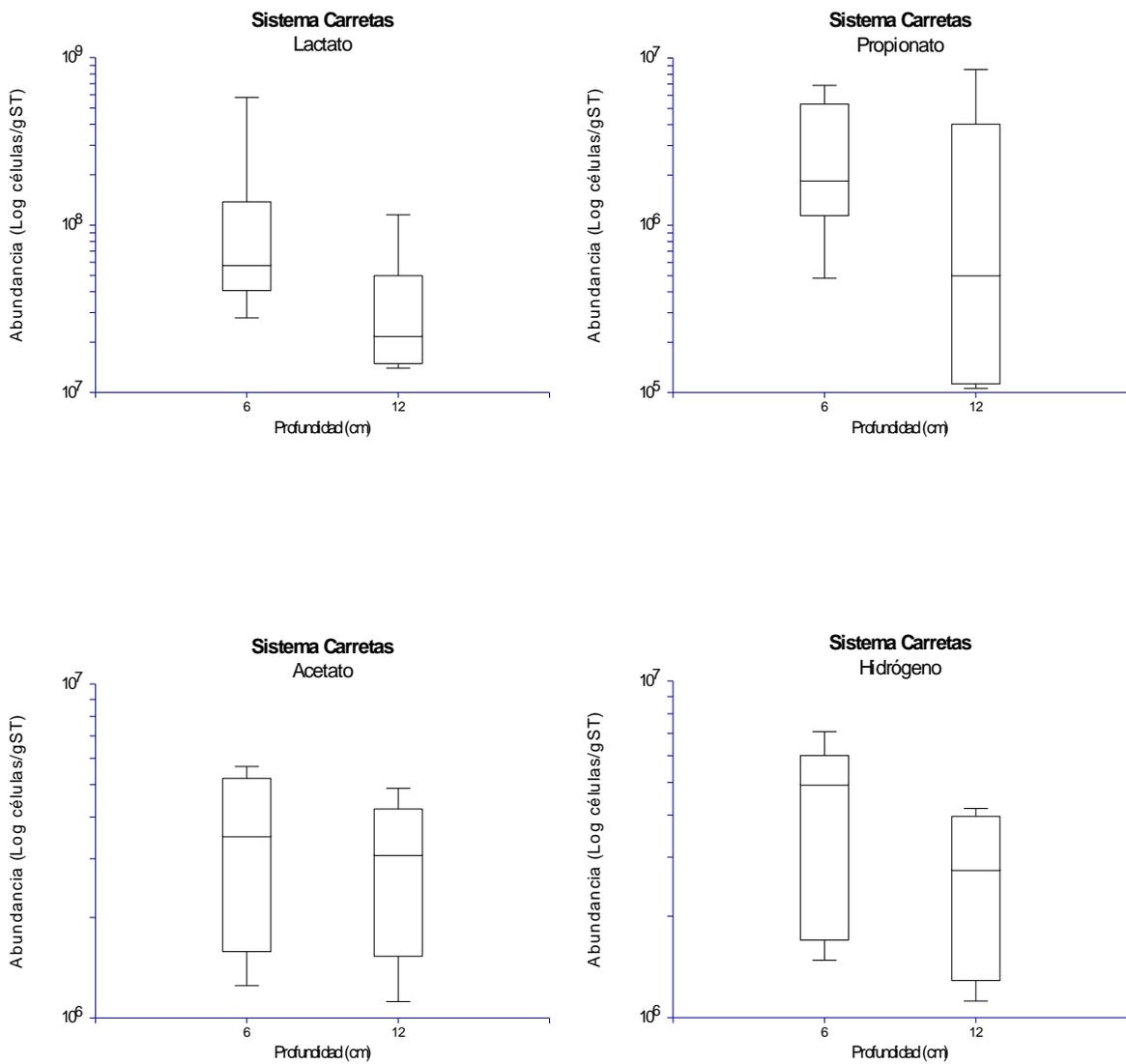


Figura 39. Distribución vertical de las bacterias sulfatorreductoras, durante la época de lluvias, en el sedimento de las lagunas del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

En lo que respecta a las AM, éstas tuvieron un comportamiento inverso, es decir, su densidad se incrementó en el estrato del fondo (6-12 cm). Este patrón de distribución se observó en ambos sistemas lagunares (Figs. 40-43). No obstante lo anterior, el patrón de distribución espacial de las BSR y las AM no fue significativo.

Como se mencionó anteriormente la producción de metano no se excluye por el proceso de sulfatorreducción, aunque la metanogénesis es menor en los estratos con mayor contenido de sulfatos, como lo demuestran las cuantificaciones de AM obtenidas en este estudio (más abundantes a mayor profundidad). Al descender la concentración de sulfatos, las AM se hacen más competitivas y dominan sobre las BSR; asimismo al incrementarse la profundidad, el descenso del Eh en el sedimento también contribuye a favorecer el desarrollo de las AM. Cappenberg y Prins (1974) determinaron en sedimentos lacustres el número máximo de BSR a una profundidad de 0-2 cm con un Eh de -100 a -150 mV, mientras que las AM se ubicaron entre 3-6 cm con un Eh de -250 a -300 mV (Tabla 21):

**Tabla 21. Distribución vertical de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas en sedimentos lacustres (Cappenberg & Prins, 1974).**

Profundidad cm	BSR Lactato/l	AM Acetato/l	AM Metanol/l	AM Hidrógeno/l
0-2	15-30x10 <sup>5</sup>	15-20x10 <sup>5</sup>	5-10x10 <sup>5</sup>	30-100x10 <sup>5</sup>
3-6	0.5-8x10 <sup>5</sup>	100-250x10 <sup>5</sup>	60-300x10 <sup>5</sup>	10-200x10 <sup>5</sup>

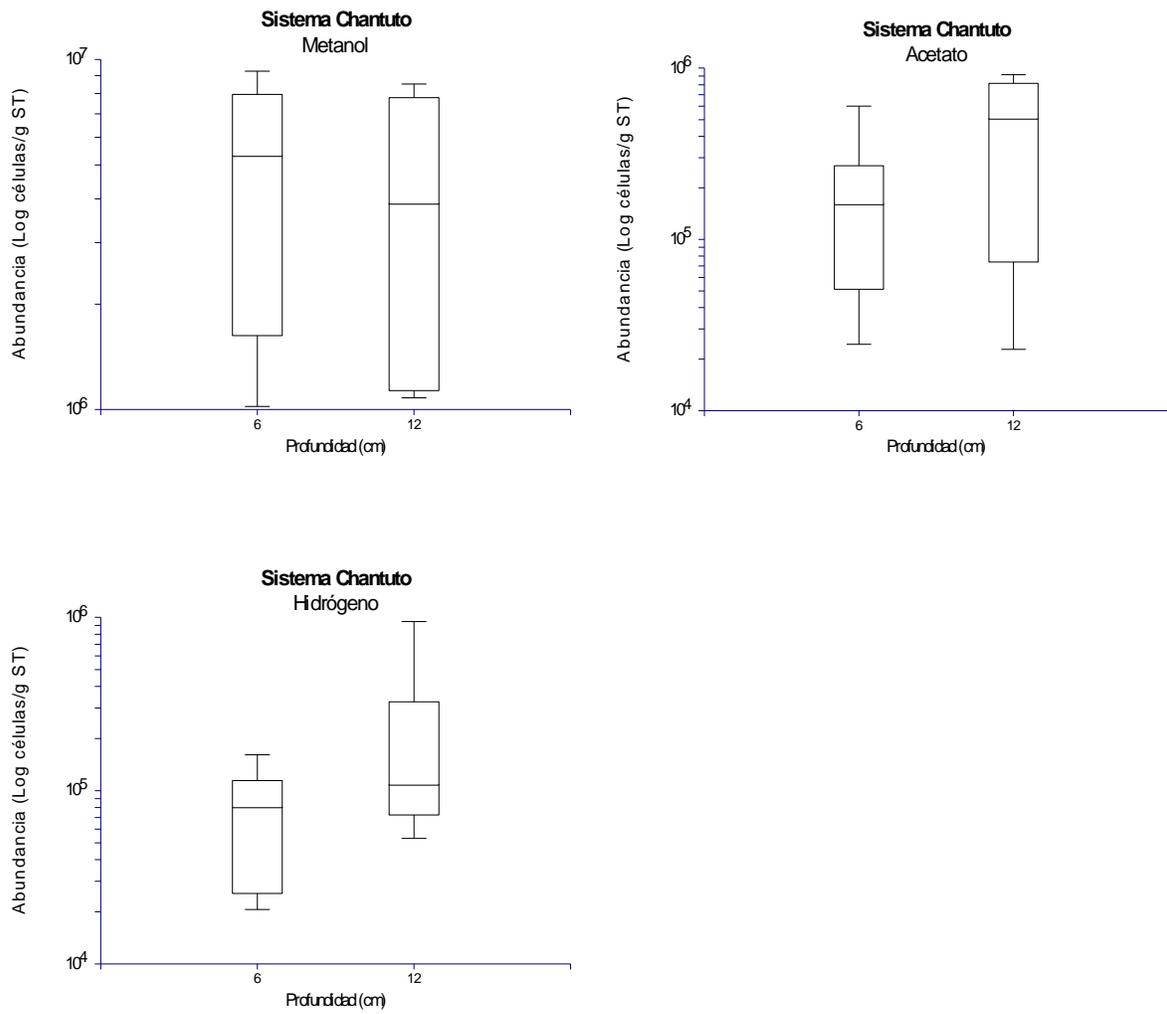


Figura 40. Distribución vertical de las arqueas metanogénicas, durante la época de secas, en el sedimento de las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

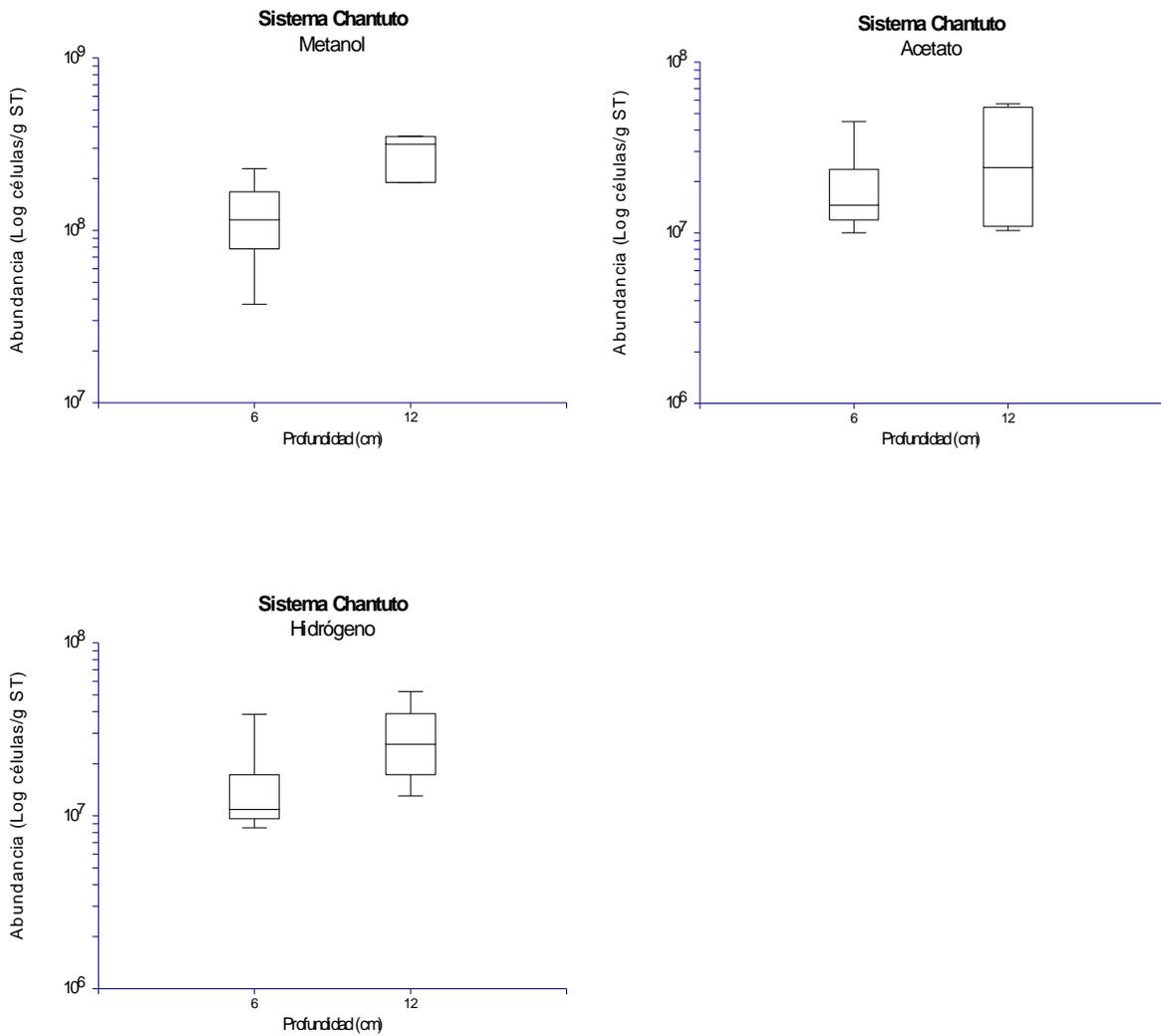


Figura 41. Distribución vertical de las arqueas metanogénicas, durante la época de lluvias, en el sedimento de las lagunas del sistema Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

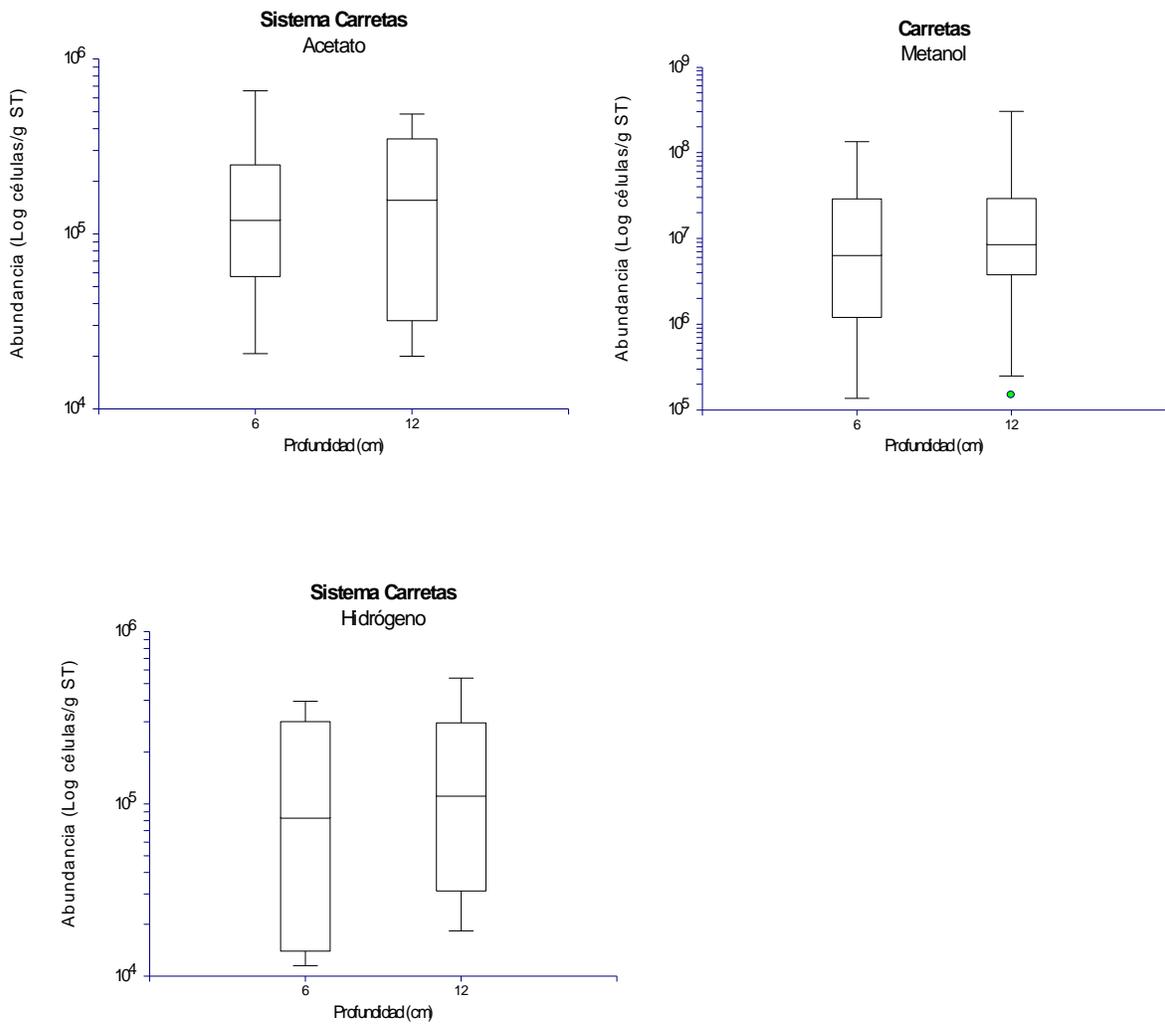


Figura 42. Distribución vertical de las arqueas metanogénicas, durante la época de secas, en el sedimento de las lagunas del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

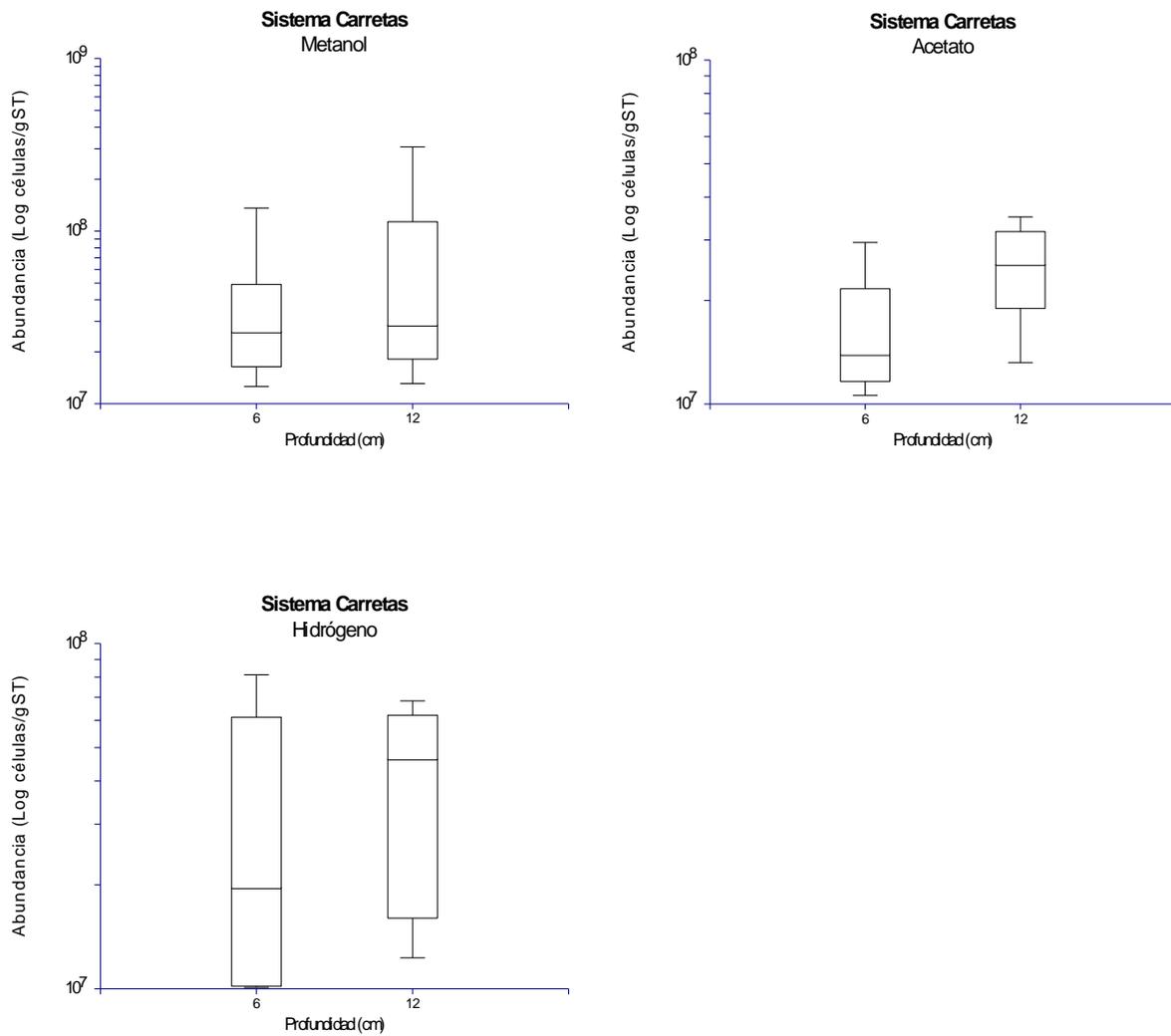


Figura 43. Distribución vertical de las arqueas metanogénicas, durante la época de lluvias, en el sedimento de las lagunas del sistema Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

## **ACTIVIDAD CINÉTICA.**

En las pruebas cinéticas efectuadas, la presencia de otros ácidos grasos volátiles (además del acetato) demuestra que hubo procesos de fermentación de la materia orgánica en los sedimentos, lo que dió como resultado la formación de diferentes ácidos grasos volátiles. Algunos de ellos pudieron ser empleados como sustrato en los procesos de sulfatorreducción y metanogénesis. La aparición constante del acetato junto con otros intermediarios (butirato y propionato) es similar a lo registrado en otros estudios donde se ha evaluado la actividad metanogénica (Kotsyurbenko *et al.*, 2004). La producción de acetato no sólo puede atribuirse al mecanismo de la fermentación, sino que también puede ser el resultado de la actividad de las BSR que oxidan incompletamente otros sustratos, como el lactato o el propionato. En el presente estudio, la presencia de estos grupos bacterianos quedó demostrada a partir de los conteos de las BSR con lactato y propionato. El acetato producido por éstas, puede ser subsecuentemente utilizado como sustrato por las AM, dando lugar a una interrelación ecológica denominada comensalismo entre estos grupos nutricionales. Mountfort *et al.* (1980) sugieren que la función de las BSR depende de los niveles de sulfatos existentes, ya que oxidan el acetato a concentraciones elevadas, pero producen acetato a niveles bajos de sulfatos liberando sustrato para las AM.

Posterior a la fase de producción de los ácidos grasos volátiles, en los medios con sulfatos entre el séptimo día (temporada de secas) y el día 14 (temporada de lluvias) comenzó a detectarse el consumo de acetato. En los experimentos sin sulfatos en el

medio, el consumo de acetato se presentó en el séptimo día (Fig. 44). A partir de lo anterior se determinó que la actividad acetoclástica comenzó entre los días 7 y 14. Dévai *et al.* (1996) reportaron que la metanogénesis comenzaba en el día 21 y la sulfatorreducción en el día 15, pero al adicionar al medio de cultivo peptona como fuente de carbono orgánico la sulfatorreducción fue mayor entre el cuarto y sexto día de la incubación. En experimentos con sedimentos de turberas se observó que la producción de metano a partir de acetato comenzaba a partir del tercer día de incubación (Kotsyurbenko *et al.*, 2004). Por consiguiente la presencia de fuentes de carbono fácilmente degradables influyen en la actividad cinética.

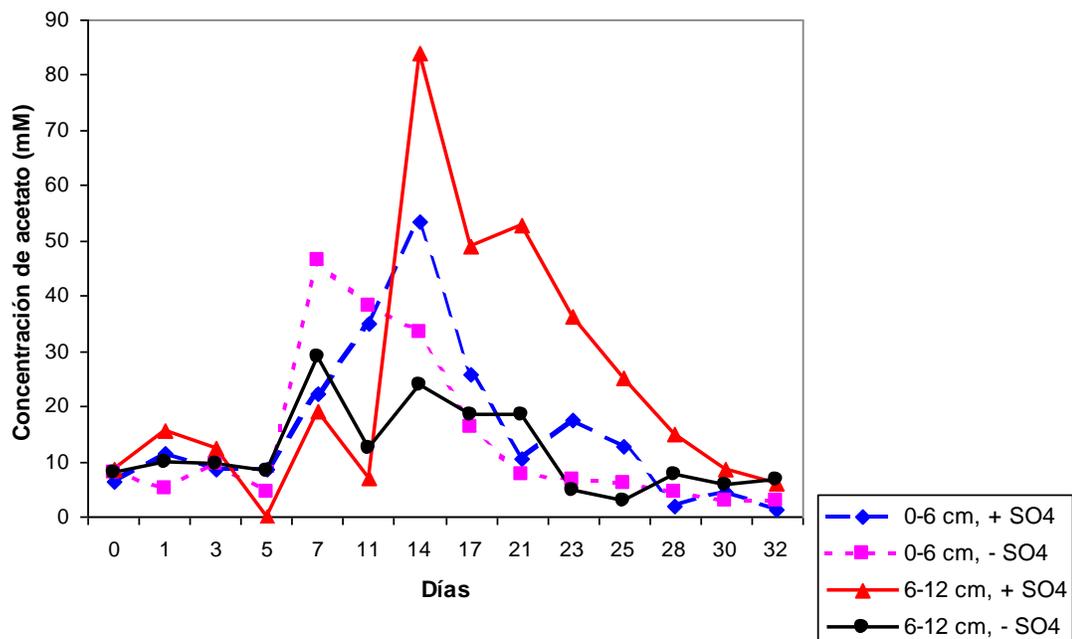


Figura 44. Producción y consumo de acetato durante las pruebas efectuadas, con y sin sulfatos en el medio, en los sedimentos de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

La máxima actividad específica observada en presencia de sulfatos en el medio, en comparación con la ausencia de los mismos, permite proponer que el metabolismo de la sulfatorreducción fue más importante (Figs. 45-46). La metanogénesis obtiene una baja producción de energía en comparación con otros procesos metabólicos anaerobios, por esta razón las AM tienen dificultad en competir por los donadores de electrones comunes cuando otras poblaciones bacterianas anaerobias están activas; por esta razón, la actividad de las AM a partir de acetato fue menor.

En lo que respecta al comportamiento estacional, en la temporada de secas la sulfatorreducción dominó porque los niveles de sulfatos fueron favorables para el desarrollo de las BSR que consumen los donadores de electrones disponibles (entre ellos acetato, que también es sustrato para las AM). En una zona de marismas salobres de una planicie deltaica en Louisiana las tasas de sulfatorreducción potencial fueron más altas en abril y disminuyeron en el mes de diciembre, asociándose este comportamiento con un incremento del tamaño de las poblaciones microbianas al aumentar la temperatura, así como con una alta concentración de sulfatos por un mayor influjo mareal (DeLaune *et al.*, 2002). Castro *et al.* (2002) en Florida cuantificaron una tasa de sulfatorreducción a partir de acetato de 0.026 y 0.119 mM/g/día en humedales prístinos y eutróficos, respectivamente. Las BSR que oxidan el acetato liberan CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, este último puede ser utilizado por las AM, presentándose entonces una relación sintrófica entre las BSR y las AM.

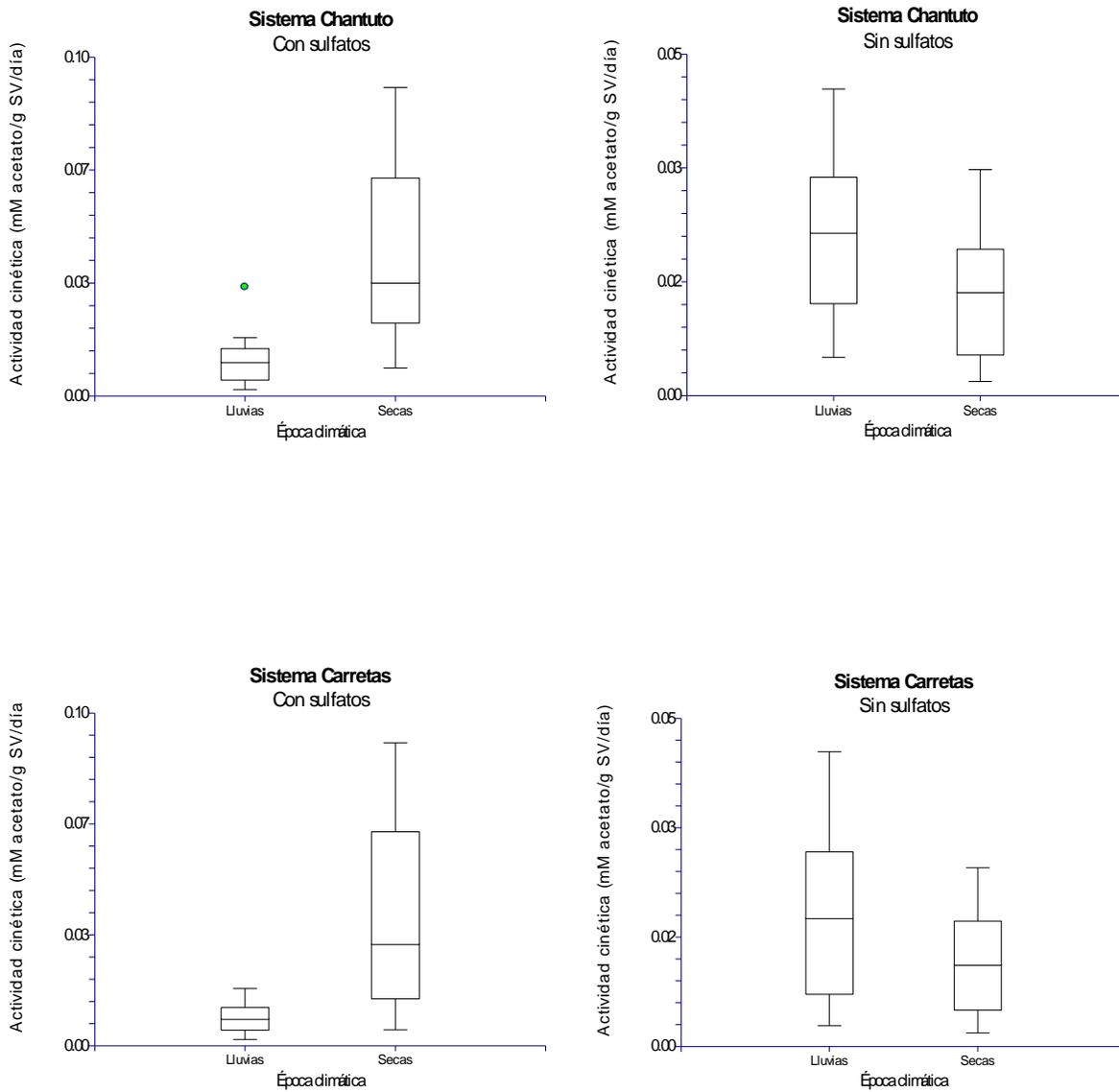
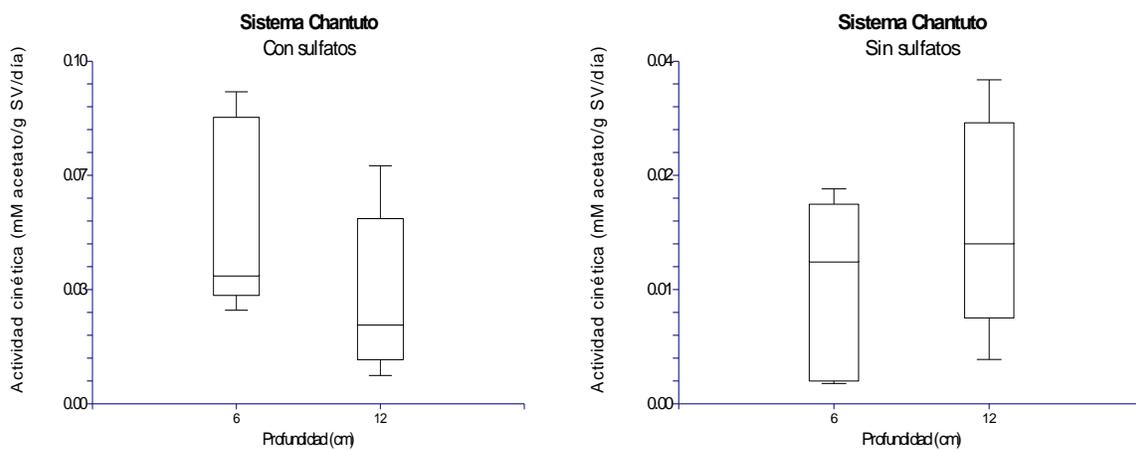


Figura 45. Variación estacional de la actividad específica a partir de acetato en los sedimentos de los sistemas lagunares Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

Por el contrario, en los meses de la temporada de lluvias la máxima actividad específica se determinó en las pruebas sin sulfatos (Fig. 45); al no existir sulfatos en el medio el desarrollo de las AM se favoreció. También en dichos meses la abundancia de las AM acetoclásticas se incrementó y descendió la de las BSR acetoclásticas. De manera general, se ha establecido que la producción de metano se encuentra limitada cuando el hidrógeno y el acetato son utilizados por metabolismos anaerobios energéticamente más favorables, pero se activa cuando disminuye la concentración de los aceptores de electrones para los otros metabolismos anaerobios. Martens y Berner (1974) determinaron que el metano se acumula en sedimentos marinos hasta que los sulfatos se agotan.

Kuivila *et al.* (1988) cuantificaron en sedimentos la producción de metano por debajo de la zona de sulfatorreducción. La contribución de la metanogénesis a la mineralización del carbono puede incrementarse en ambientes donde las tasas de sedimentación son altas (10 cm/año) debido a que una cantidad importante del carbono reactivo atraviesa rápidamente la zona de sulfatorreducción y se deposita en la zona metanogénica (Crill & Martens, 1986). Este no es el caso para los sistemas analizados, ya que las tasas de sedimentación se calcularon entre 6 y 7 cm/año.

a) Temporada de secas.



b) Temporada de lluvias.

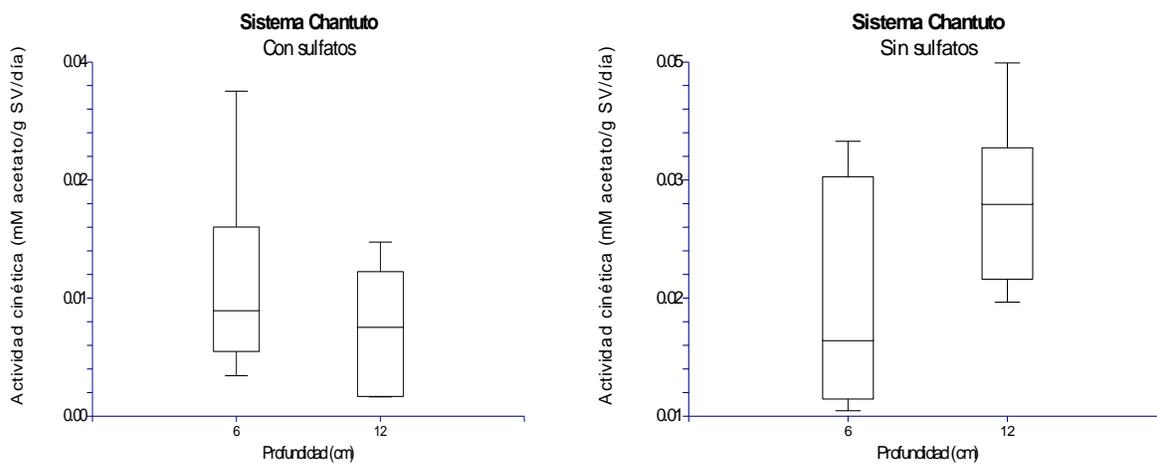
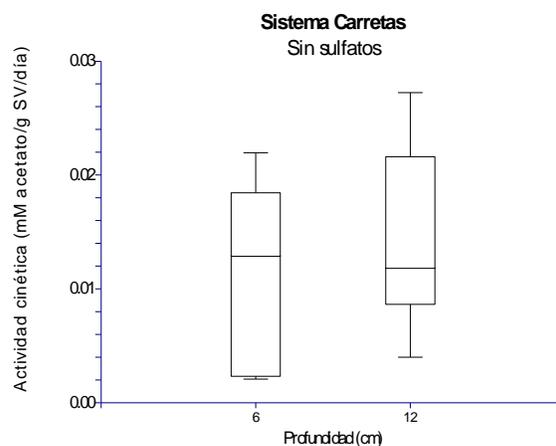
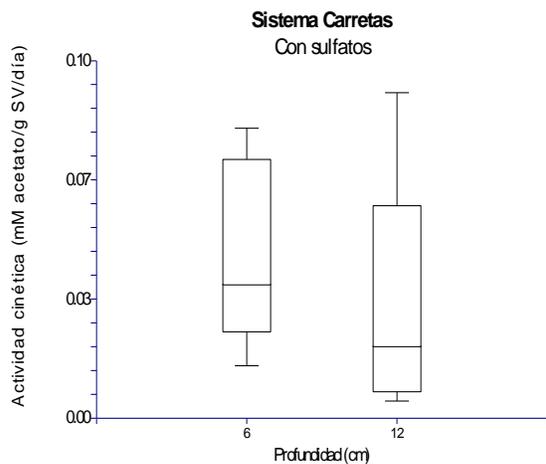


Figura 46. Variación espacial de la actividad específica a partir de acetato, en las épocas climáticas de secas y lluvias, en los sedimentos del sistema lagunar Chantuto-Panzacola (Chiapas, México).

a) Temporada de secas.



b) Temporada de lluvias.

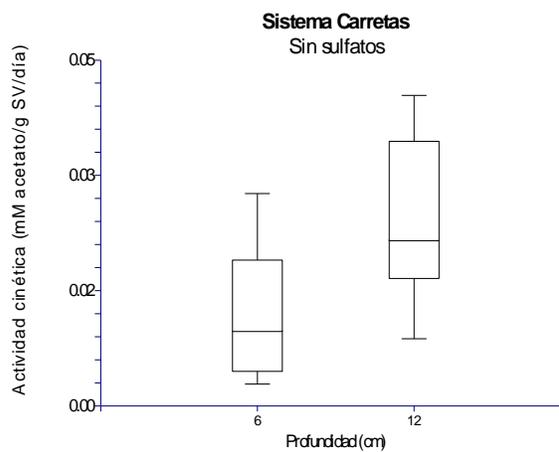
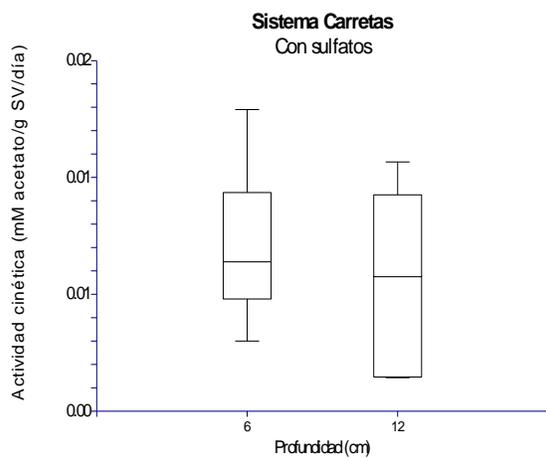


Figura 47. Variación espacial de la actividad específica a partir de acetato, en las épocas climáticas de secas y lluvias, en los sedimentos del sistema lagunar Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

Debido a que se detectó consumo de acetato, tanto en presencia como en ausencia de sulfatos, es factible proponer que el metabolismo del acetato es el resultado tanto de la sulfatorreducción como de la metanogénesis. Si bien las actividades de las bacterias sulfatorreductoras y de las arqueas metanogénicas no se excluyen mutuamente, en los sedimentos de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra se determinó que el flujo de carbono a través de la sulfatorreducción es más grande que a partir de la metanogénesis.

## ANÁLISIS MOLECULARES

La digestión del ADN con enzimas de restricción generalmente produce de 2 a 20 fragmentos de diferente tamaño que se observan como un patrón de bandas en el gel. En el presente trabajo el número de fragmentos obtenidos está entre el intervalo reportado. En el RFLP de las BSR utilizando la enzima *Bfal* se observaron 5 bandas, con tamaños que oscilaron entre las 50 y las 650 pb; por el contrario, con la enzima *HaeIII* sólo hubo 3 bandas pero de mayor tamaño (200 a 600 pb). En el caso de las AM cuando se empleó la enzima *RsaI* en el RFLP se obtuvieron 3 bandas entre 300 y 900 pb, mientras que con la enzima *AluI* un mayor número de bandas (7) se visualizaron, variando sus tamaños entre las 100 y las 900 pb (Figs. 48-49).

La finalidad de llevar a cabo un análisis de RFLP después de la PCR de BSR y AM, era determinar posibles cambios, tanto temporales como espaciales, en la composición de las comunidades sulfatorreductoras y de metanogénicas en los sedimentos estuarino-lagunares estudiados. Sin embargo, en todos los casos el patrón de bandas obtenido después de la digestión con las endonucleasas de restricción fue el mismo para las muestras de diferentes meses (mayo y octubre) y profundidades (0-6 cm y 6-12 cm) (Figs. 48-49).

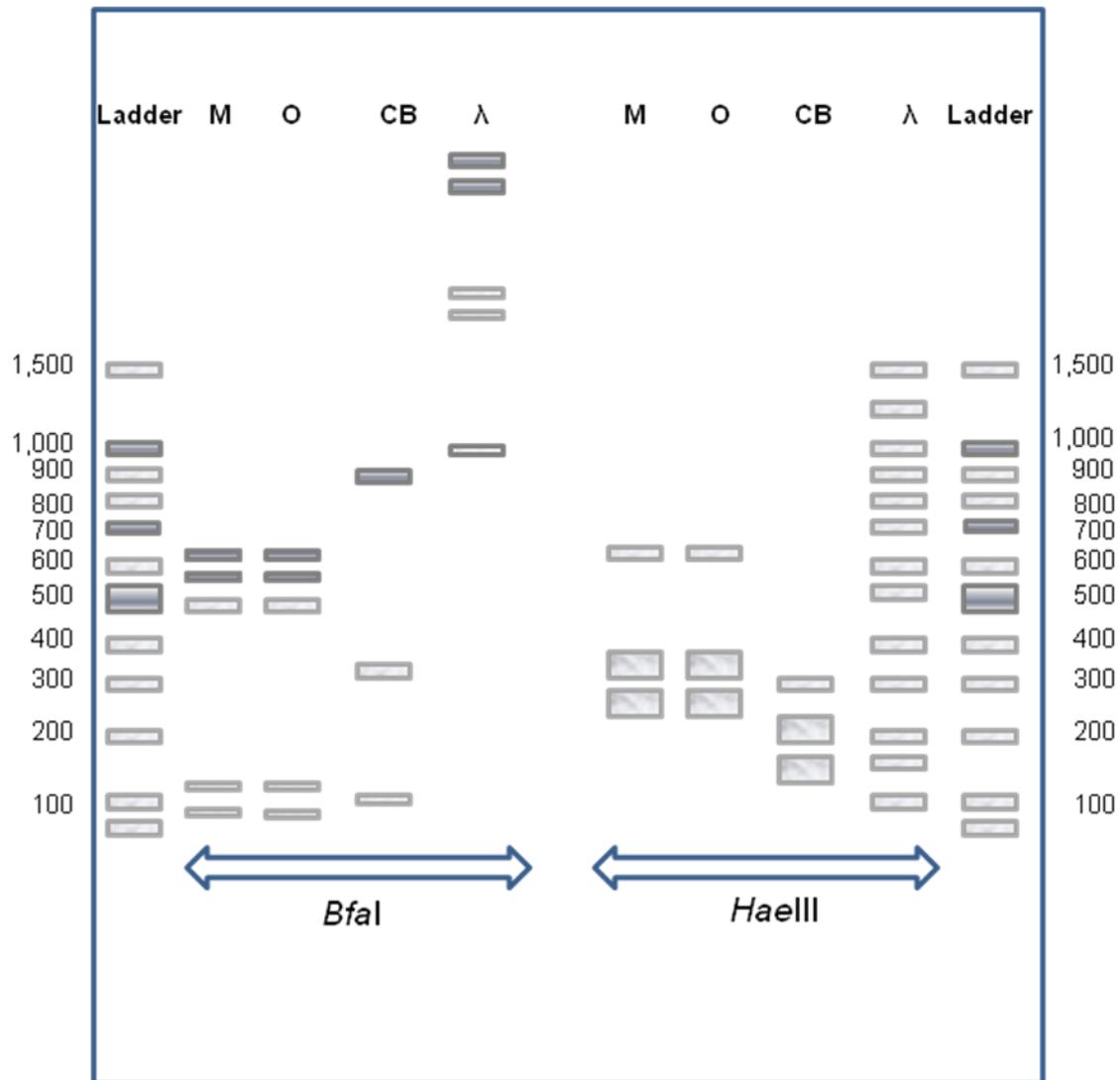


Figura 48. Patrones de restricción observados con las enzimas *Bfal* y *HaeIII* en la PCR de las bacterias sulfatorreductoras.

Claves: M = mayo. O = octubre. CB = control BSR (*Desulfovibrio*). λ = ADN del bacteriófago lambda.

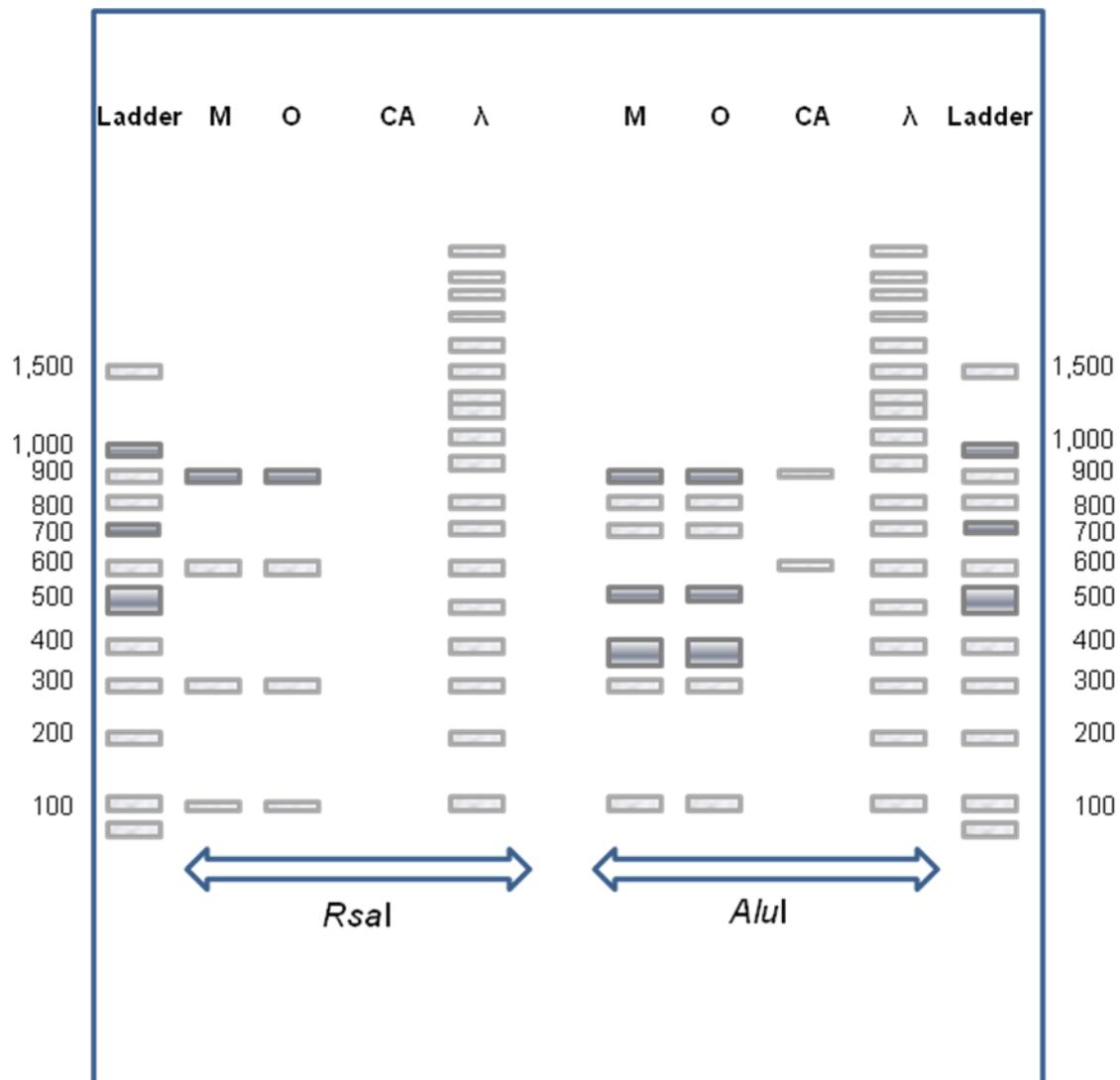


Figura 49. Patrones de restricción observados con las enzimas *RsaI* y *AluI* en la PCR de las bacterias sulfatorreductoras.

Claves: M = mayo. O = octubre. CA = control AM (*Methanosarcina mazei*).  $\lambda$  = ADN del bacteriófago lambda.

En comunidades extremadamente complejas el patrón resultante del RFLP suele ser difícil de interpretar. El RFLP es un marcador codominante, por tal motivo cuando se aplica en muestras con una diversidad alta, las diferencias difícilmente se manifiestan a través de distintos patrones de bandas; generalmente lo que se obtiene es el mismo patrón, pero con bandas de diferente intensidad (Parker *et al.*, 1998), como lo que se observó en este estudio. Los patrones idénticos no necesariamente indican que no existan diferencias entre las muestras analizadas, ya que los fragmentos de ácidos nucleicos que tienen el mismo tamaño pueden diferir sustancialmente entre sí por sus estructuras primarias (González *et al.*, 2005; Ludwig, 2007)

Por lo anterior, el método del RFLP puede ser útil cuando se aplica para diferenciar sistemas de baja diversidad o cepas; o bien, cuando se realiza después de que el producto de la PCR fue clonado y secuenciado. Whitby *et al.* (2004) en sedimentos lacustres eutróficos determinaron la diversidad de la comunidad metanogénica mediante PCR-RFLP; sin embargo, antes del RFLP se clonó y secuenció los productos amplificados de la PCR. Con esta estrategia obtuvieron una biblioteca de 157 clones, de los cuales 117 los sometieron a digestión con 12 enzimas de restricción diferentes, estableciendo que las enzimas *HindIII*, *XhoI* y *HinfI* son las que permiten una mejor diferenciación de las AM. En otro estudio se demostró que las enzimas *HaeIII* y *HhaI* permiten diferenciar 10 especies de AM (Hiraishi *et al.*, 1995). En el presente estudio el empleo de la endonucleasa de restricción *HaeIII* permitió observar un patrón de bandas (aunque difuso) en el RFLP de las BSR, en el caso de las AM el resultado fue negativo.

Aunado a lo anterior no se obtuvo una visualización clara de los patrones de bandas. Weatherhead y Montgomerie (1991) mencionan que se requieren cantidades significativas de ADN para llevar a cabo el análisis por RFLP y obtener un patrón de bandas con una alta definición. En este estudio, la mayoría de las muestras del producto purificado de la PCR sometidas al RFLP tuvieron una concentración igual o superior a los 250 ng de ADN. Por su parte, Scow *et al.* (2001) mencionan que se puede obtener un “barrido” en el gel como resultado de la digestión incompleta por las endonucleasas de restricción.

### **10.3. MINERALIZACIÓN ANAEROBIA EN LAGUNAS COSTERAS TROPICALES. UN MODELO CONCEPTUAL**

Se ha establecido que en los estuarios, caracterizados por la presencia de un gradiente de salinidad desde la porción dulceacuícola hacia la zona marina en la boca del río, existe una separación espacial de los procesos anaerobios terminales. A lo largo del gradiente, la degradación de la materia orgánica en las fases terminales anaerobias está dominada por las BSR en la zona marina con altos contenidos de sulfatos, mientras que en la porción dulceacuícola (con bajos contenidos de sulfatos) prevalece la metanogénesis, por lo que el factor clave que controla la dominancia de los procesos de mineralización es la disponibilidad de sulfatos (Takii & Fukui, 1991; Purdy *et al.*, 2001). Purdy *et al.* (2002) reportaron que la metanogénesis es el proceso más importante en la porción dulceacuícola del estuario Colne (Reino Unido), mientras que la sulfatorreducción domina en la porción salobre y marina. En otros trabajos se menciona que la disponibilidad y calidad de los sustratos también actúan como un factor relacionado con la distribución de las comunidades microbianas sulfatorreductoras y metanogénicas (Schaub & Gemerden, 1996).

Las lagunas costeras, al contrario que los estuarios, se caracterizan por presentar un flujo restringido con el mar, aunado al efecto de aportes dulceacuícolas altamente variables que determinan la magnitud de la descarga de los ríos que desembocan en ellas. Estas características influyen en los procesos biogeoquímicos (por ejemplo, la degradación de la materia orgánica) que se llevan

a cabo en los sedimentos.

Las lagunas costeras del sistema Chantuto-Panzacola (Cerritos, Campón) y Carretas-Pereyra (Pereyra y Bobo) forman parte de un ecosistema dinámico que se ve impactado por las grandes variaciones que se registran en la precipitación y en el flujo de sus ríos tributarios a lo largo del año. Los cambios generados por estos factores modifican la distribución y abundancia de las bacterias sulfatorreductoras y de las arqueas metanogénicas, aunque los dos grupos, aparentemente, son capaces de adaptarse a los cambios ambientales.

A continuación se propone un modelo conceptual que contribuye a explicar el comportamiento estacional de las microbiotas sulfatorreductora y metanogénica en las lagunas de estudio como resultado de los cambios en la descarga de los ríos. Este modelo está basado en el modelo de Eyre (1998) propuesto para explicar el efecto de los cambios estacionales extremos en el procesamiento de materiales disueltos (orgánicos e inorgánicos) en estuarios subtropicales y tropicales en Australia.

Aplicando el esquema general de Eyre a los procesos terminales involucrados con la mineralización anaerobia de la materia orgánica en los sistemas de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, se observa que en los meses asociados a la temporada de lluvias, el aumento en el flujo de los ríos a las lagunas ocasiona un mayor aporte de materiales orgánicos y la presencia de condiciones dulceacuícolas, aunado a una mayor resuspensión de partículas en la columna de

agua (107-224 UTJ). Como resultado de la resuspensión se incrementa la presencia de espacios intersticiales en el sedimento, aumentando su porosidad. Conforme la porosidad de los sedimentos aumenta, se registra un cambio electroquímico que genera potenciales de óxido-reducción menos reductores. Las características ambientales de esta temporada, principalmente baja salinidad y contenido de sulfatos, determinan que la densidad y la actividad de las BSR disminuya, incrementándose la abundancia y actividad de las AM con el siguiente orden decreciente por sustrato: metanol > acetato > hidrógeno (Fig. 50).

En la temporada de secas, disminuye el aporte fluvial y la turbidez de la columna de agua (31-126 UTJ), causando un aumento en el contenido de sólidos y una disminución de la porosidad del sedimento, presentándose condiciones de óxido-reducción más negativas. La disminución del aporte fluvial y el aumento de temperatura provocan un incremento de la salinidad y altos contenidos de sulfatos. Con estas condiciones las BSR son más abundantes, con el siguiente orden por sustrato: lactato > propionato > acetato > hidrógeno. En el caso de las AM, su densidad y actividad disminuyen. Se propone que este mecanismo es cíclico y fuertemente controlado por cambios en la salinidad como resultado de las variaciones estacionales de la descarga de los ríos (Fig. 51).

**TEMPORADA DE LLUVIAS**

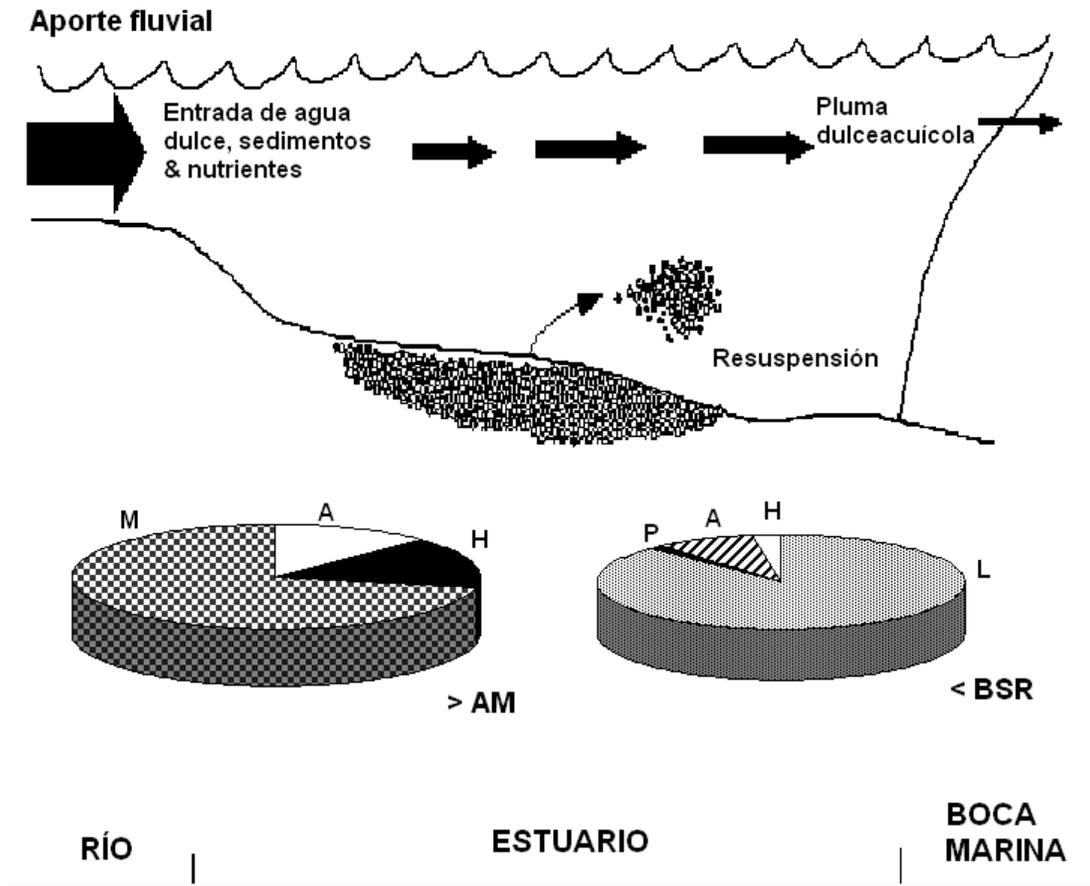


Figura 50. Modelo conceptual propuesto para explicar la dinámica de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas, durante la temporada de lluvias, en el sedimento de las lagunas costeras de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

## TEMPORADA DE SECAS

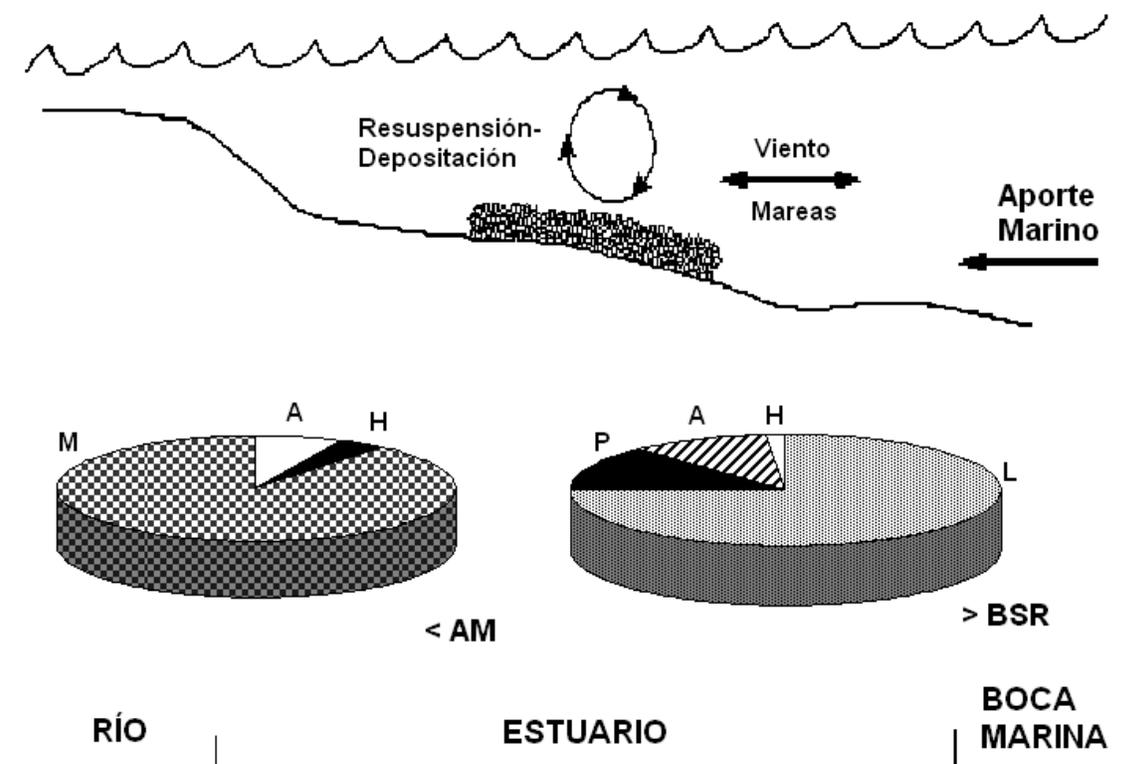


Figura 51. Modelo conceptual propuesto para explicar la dinámica de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas, durante la temporada de secas, en el sedimento de las lagunas costeras de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra (Chiapas, México).

Espacialmente, la dominancia de las bacterias sulfatorreductoras sobre las arqueas metanogénicas en los primeros seis centímetros de la fase sedimentaria, se puede atribuir a la presencia constante de sulfatos en el medio, que les permite competir de manera más efectiva con las AM por los donadores de electrones, permitiendo que se mantengan metabólicamente activas a esta profundidad del sedimento; su mayor abundancia a dicha profundidad también se relaciona con los valores del potencial redox cuantificados en los primeros estratos, ya que las BSR no requieren condiciones tan reducidas para crecer como las AM.

En la profundidad donde se presentó un mayor contenido de sulfatos, la sulfatorreducción se llevo a cabo a expensas de ácidos grasos de cadena corta e hidrógeno, mientras que la metanogénesis se presentó principalmente a expensas de substratos no competitivos como el metanol (Oremland *et al.*, 1982; King, 1984), aunque también se desarrollaron las AM hidrogenofílicas y acetoclásticas .

La abundancia de BSR que utilizan lactato en los primeros centímetros del sedimento, aunada a la presencia de AM acetoclásticas en zonas más profundas, implica la existencia de una relación ecológica de comensalismo entre estas comunidades microbianas, lo cual parece obedecer al hecho de que la metanogénesis es dependiente de la producción de acetato a partir de la degradación del lactato por medio de las BSR. Se propone el siguiente esquema de mineralización anaerobia para explicar la dinámica espacial de la microbiota sulfatorreductora y metanogénica:

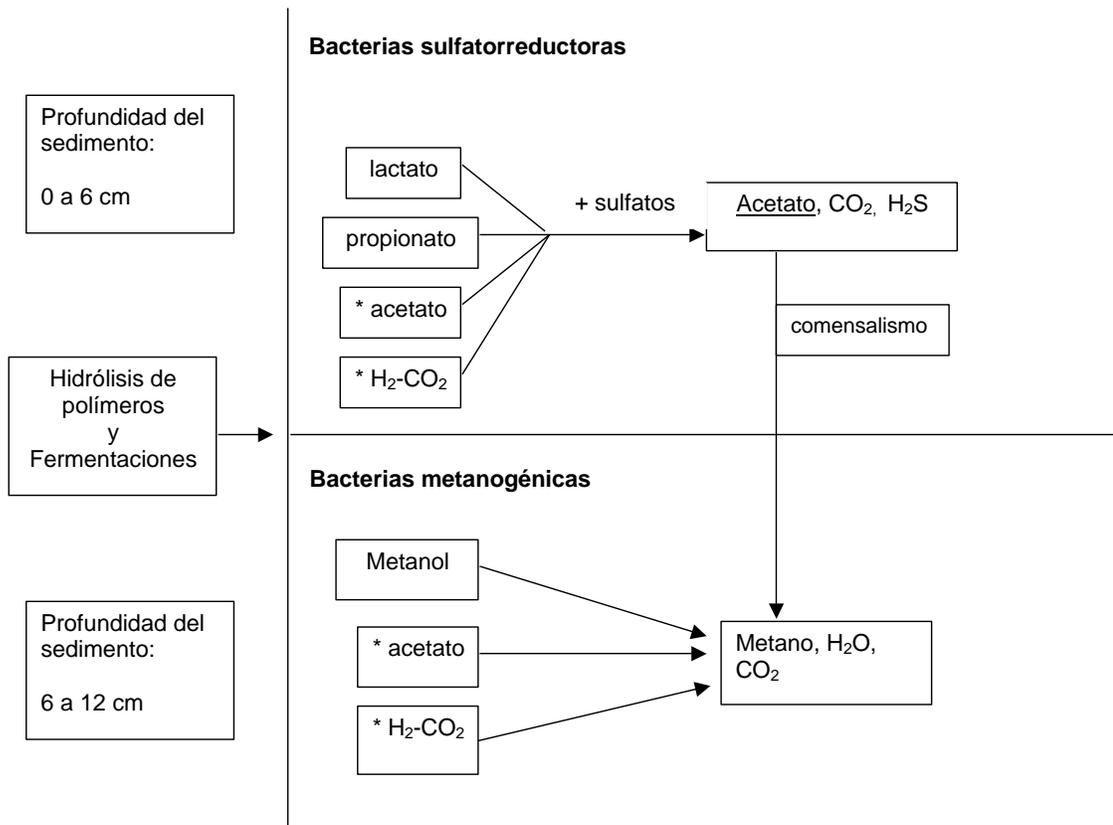


Figura 52. Modelo conceptual propuesto para explicar la dinámica espacial de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas en el sedimento de las lagunas de los sistemas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra, Chiapas.

## 11. CONCLUSIONES

Los flujos terminales de carbono y electrones durante los procesos anaerobios de descomposición orgánica en los sistemas estuarino-lagunares comprenden la sulfatorreducción y la metanogénesis, las comunidades microbianas encargadas de efectuar dichos procesos aparentemente se adaptan a los cambios físicos y químicos registrados en las lagunas de los sistemas de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra.

En las lagunas estudiadas, la mayor abundancia de las bacterias sulfatorreductoras se presentó en los meses de secas (febrero, mayo y junio) y la mínima en el período de lluvias. Durante la época de secas las condiciones ambientales existentes, principalmente una mayor salinidad y concentración de sulfatos, favorecieron el crecimiento de las poblaciones sulfatorreductoras.

El lactato fue un sustrato importante para las bacterias sulfatorreductoras, como lo comprueba el número cuantificado de éstas a partir de dicho sustrato, aunque esto no descarta la contribución del propionato y del acetato, ya que éstos representan donadores de electrones importantes en ambientes caracterizados por la presencia de sales y sulfatos.

Por el contrario, en los meses de la temporada de lluvias (julio, octubre y noviembre), aumentó la abundancia de las arqueas metanogénicas debido al incremento del caudal de los ríos que fluyen a las lagunas, lo que dio como

resultado una disminución de la salinidad y la concentración de sulfatos, así como un alto contenido de carbohidratos y carbono orgánico.

En lo que se refiere a la utilización de sustratos, la abundancia de arqueas metanogénicas fue mayor a partir de metanol, porque éste contribuye a que dicha microbiota mantenga su población en presencia de sulfatos. Las bacterias sulfatorreductoras son competidores pobres por el metanol.

En las lagunas de los sistemas de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra no se presentó limitación de sulfatos ni de materia orgánica, la presencia tanto de aceptores como de donadores de electrones permitió una degradación anaerobia completa del carbono orgánico por medio de los procesos de sulfatorreducción y metanogénesis. Puesto que el sulfato siempre está disponible en las lagunas estudiadas, se puede asumir que la degradación de la materia orgánica se lleva a cabo principalmente por medio del proceso de sulfatorreducción, sin descartar la actividad metanogénica, la cual aparentemente es importante en la época de lluvias.

En las lagunas costeras tropicales de Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra la disponibilidad de sulfatos es un factor clave a nivel temporal para la diversidad funcional de las comunidades sulfatorreductoras y metanogénicas, a diferencia de los estuarios de zonas templadas donde la cantidad de sulfatos es importante para estas comunidades a nivel espacial.

La aplicación del método del RFLP, en el producto amplificado en la PCR, para determinar variaciones temporales y espaciales en la composición de las comunidades sulfatorreductora y metanogénica no proporciona información útil en muestras complejas. Se requiere una clonación y secuenciación previa del producto de la PCR antes de llevar a cabo el RFLP, así como llevar a cabo un mayor número de digestiones con diferentes enzimas de restricción. Estas estrategias demandan una mayor cantidad de tiempo y recursos económicos.

## **12. PERSPECTIVAS FUTURAS.**

En México y en general en las zonas tropicales, los trabajos relacionados con la investigación de los procesos anaerobios implicados en las fases terminales de la mineralización de la materia orgánica en las lagunas costeras son escasos, no obstante que dichos procesos son básicos en el funcionamiento de este tipo de ecosistemas, los cuales están considerados entre los más productivos del planeta.

El presente estudio representa una contribución al conocimiento de la mineralización anaerobia de la materia orgánica, a través del análisis de la diversidad funcional de las comunidades sulfatorreductora y metanogénica en los sedimentos bentónicos de dos sistemas estuarino-lagunares, con una comunicación permanente con el mar, localizados en la costa del Pacífico mexicano (Estado de Chiapas). A partir de los resultados derivados de este trabajo se plantean nuevas propuestas de trabajo:

1. Explorar los datos obtenidos con técnicas estadísticas multivariadas (análisis de componentes principales y de correspondencia) para determinar la correlación de las variables ambientales con componentes específicos de las comunidades microbianas.
2. Investigar qué microgradientes ambientales en los sedimentos estuarinos (textura, perfiles químicos) se correlacionan más estrechamente con la composición o con los patrones de las comunidades sulfatorreductoras y metanogénicas.

3. Estudiar la biodiversidad sulfatorreductora y metanogénica en ecosistemas estuarinos tropicales. El conocimiento de la diversidad de estos microorganismos puede contribuir a generar información básica que ayude detallar los ciclos del carbono y del azufre en estos ecosistemas. Las técnicas moleculares de clonación y secuenciación podrían aplicarse para este caso, inclusive los datos de las secuencias pueden utilizarse para construir árboles filogenéticos que representen las relaciones evolutivas de las especies presentes en el ecosistema.
  
4. Llevar a cabo estudios sobre la dinámica de la mineralización anaerobia terminal en lagunas costeras de bocas efímeras, tanto en sedimentos bentónicos como asociados a humedales (manglares).

## 13. ANEXO METODOLÓGICO

### I. VARIABLES FISICO-QUÍMICAS

#### 1. Determinación de sulfatos. Método de Howarth (1978).

Este método involucra la precipitación de sulfato de bario en una solución ácida de EDTA, la disolución del precipitado en un exceso de EDTA con pH básico y la posterior titulación del exceso de EDTA con  $MgCl_2$  empleando negro de ericromo como indicador. La técnica es confiable en una gran variedad de condiciones químicas en el agua intersticial de sedimentos estuarinos: intervalo de salinidades desde dulceacuícolas hasta 30 ups, concentraciones variables de metales, fosfatos, aniones de azufre reducidos y materia orgánica.

#### Procedimiento

Se prepara una curva de calibración a partir de una muestra de agua de mar con clorinidad conocida (19.3675 ups). La concentración de sulfatos en el estándar se calculó como 2.777 g/L (24°C) asumiendo una relación sulfato:cloruro de 0.1400 (Morris & Riley, 1966) y una densidad de 1,024 kg/L (Pickard, 1963). En la figura 53 se indica el procedimiento para el análisis del contenido de sulfatos en las muestras y estándares, en ambos casos se trabajó con duplicados.

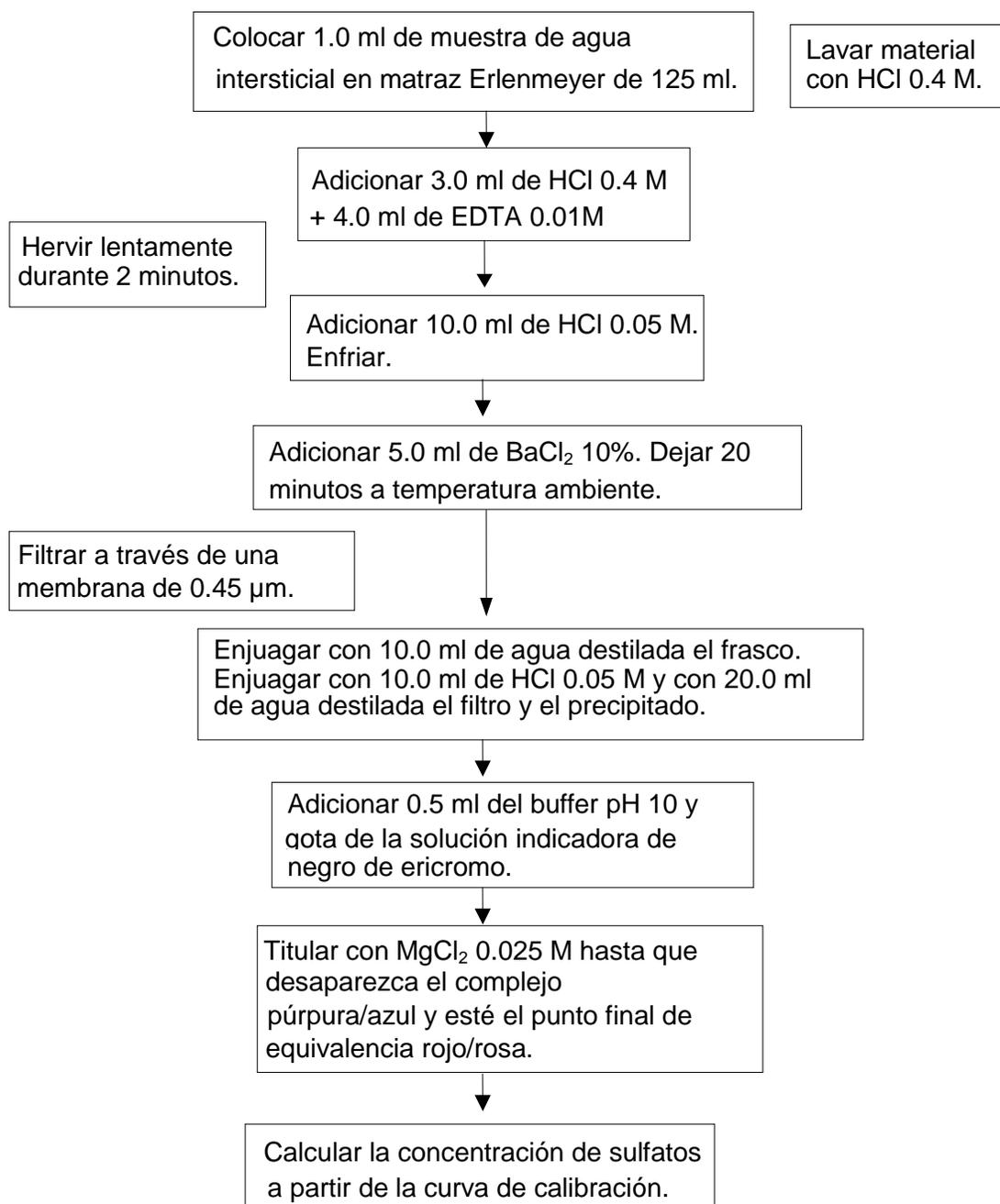


Figura 53. Análisis de sulfatos en el agua intersticial.

2. Análisis de carbohidratos. Método del Fenol Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956; Strickland & Parsons, 1972).

Este método permite la determinación de monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluyendo los metil éteres con grupos reductores libres. El método se basa en la hidrólisis de los azúcares con ácido sulfúrico, que en presencia de fenol y sulfato de hidracina forman furfural o hidroximetilfurfural de color amarillo que se lee a 490 nm. La reacción es sensible hasta 10 µg/mL y el color es estable durante 3 horas.

#### Procedimiento

Se prepara una solución estándar de 100 mg de glucosa por litro, a partir de ésta se hacen diluciones (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/L) y se tratan de la misma manera que las muestras como se esquematiza en la figura 54. Tanto los estándares como las muestras se procesan por duplicado. La concentración de carbohidratos en la muestra se calcula a partir de la curva de calibración.

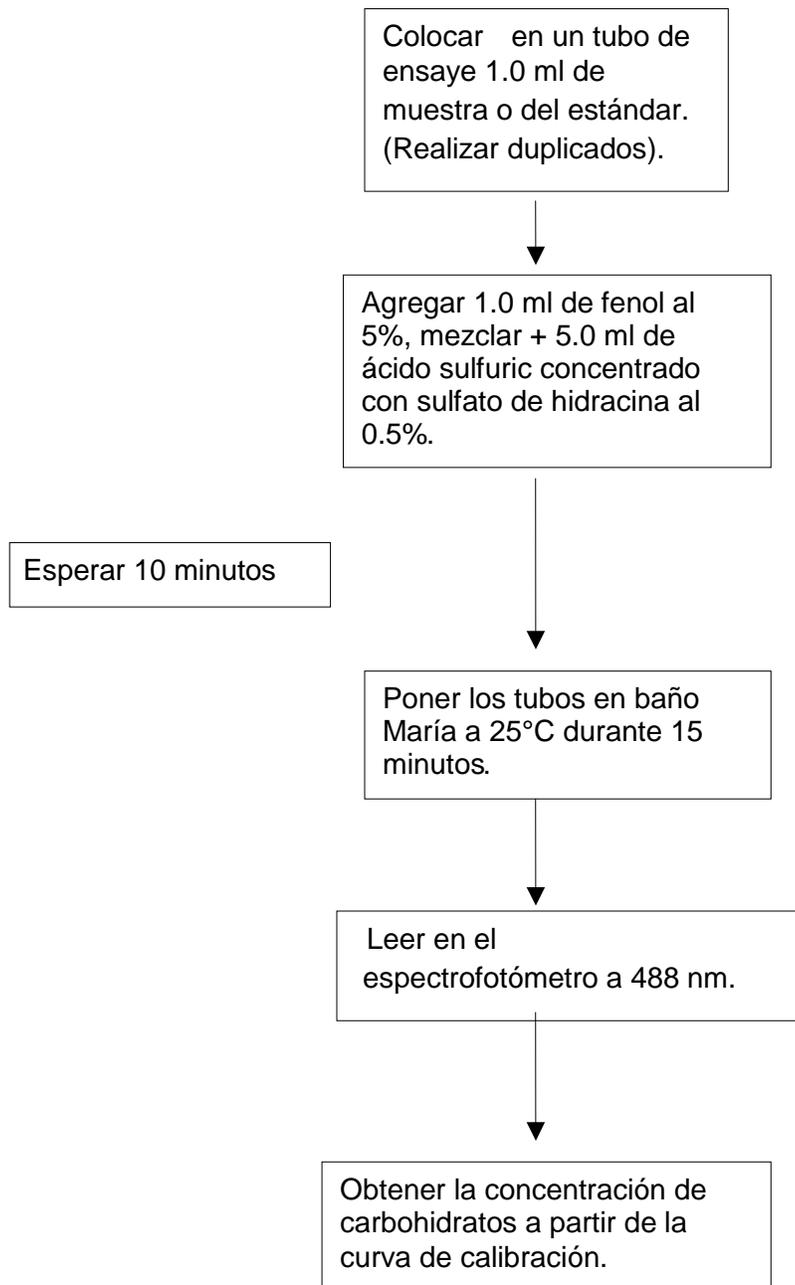


Figura 54. Análisis de carbohidratos.

3. Determinación del contenido de carbono orgánico por el Método Titulométrico (Gaudette *et al.*, 1974).

En esta técnica se lleva a cabo una oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, seguida de una titulación del exceso de dicromato con sulfato ferroso amoniacal. El método tiene una precisión de menos de  $\pm 0.25\%$ .

#### Procedimiento

Las muestras se procesan por duplicado como se esquematiza en la figura 55. Se trabaja también con dos blancos de agua destilada, siguiendo el mismo procedimiento. Para calcular el porcentaje de carbono orgánico se emplea la fórmula:

$$\% \text{ carbono orgánico} = 10 [1 - (A/B)] (0.003) (100/C)$$

donde:

A = ml de sulfato ferroso utilizado en la titulación de la muestra.

B = promedio de los ml de sulfato ferroso utilizado en la titulación de los blancos.

C = peso de la muestra de sedimento en g.

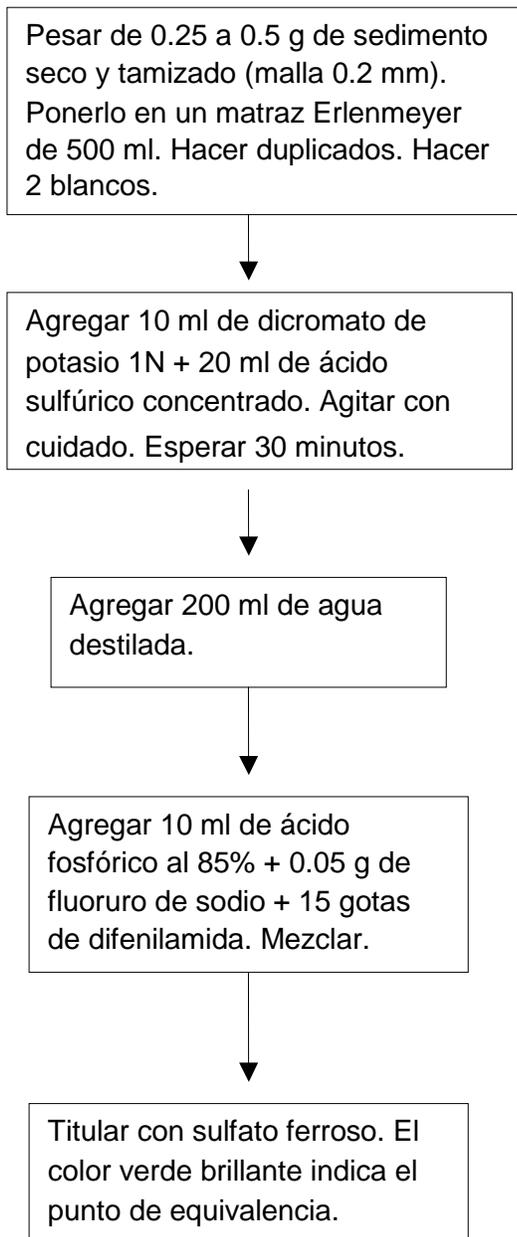


Figura 55. Determinación del contenido de carbono orgánico.

4. Determinación del contenido de sólidos totales y volátiles (APHA *et al.*, 1989).

El método tiene una aplicación de 4 a 20,000 mg/L. En éste, el término de sólidos totales se refiere a la materia sólida presente en la muestra que queda después de evaporar a sequedad a 103-105°C. El término de sólidos volátiles hace referencia a la fracción orgánica en la muestra obtenida después de la ignición durante 30 minutos en la mufla a 550°C (Fig. 56).

El contenido de los sólidos totales se calcula a partir de la fórmula:

$$\text{mg/L ST} = \frac{P2 - P1 \times 1000}{B}$$

mientras que la cantidad de sólidos volátiles se determina mediante la fórmula:

$$\text{mg/L SV} = \frac{P2 - P3 \times 1000}{B}$$

donde:

P1 = peso constante del crisol vacío.

P2 = peso del crisol después de sequedad a 103°C.

P3 = peso del crisol después de ignición a 550°C.

B = volumen de la muestra centrifugado.

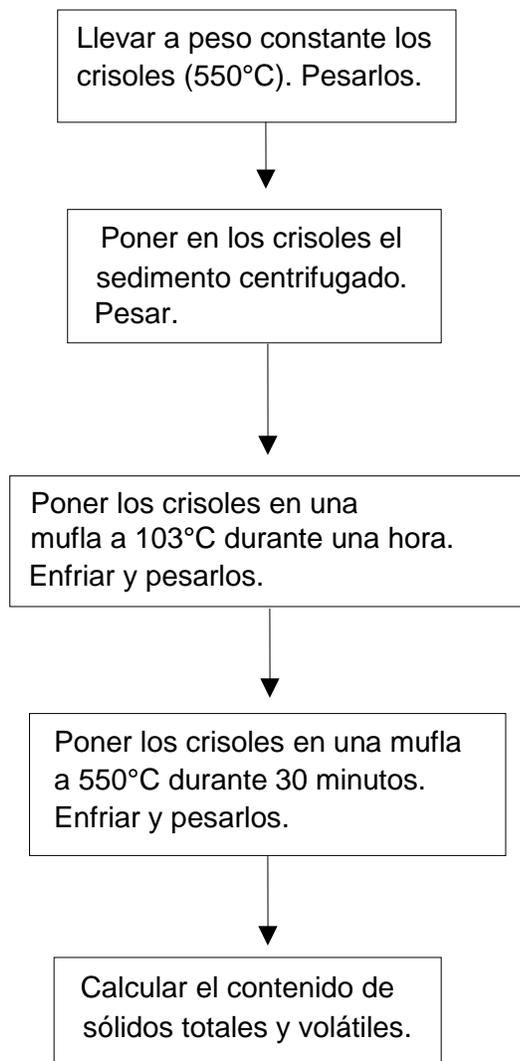


Figura 56. Determinación del contenido de sólidos totales y volátiles.

## II. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

### 1. Abundancia de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas.

#### Procedimiento

Se trabajó con el método del Número Más Probable (NMP), en el cual se utilizan medios de cultivo líquidos, lo que evita la necesidad de añadirles el agar como agente solidificante. En las Tablas 22-25 se presenta la composición de los medios específicos utilizados para la enumeración de las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas. El procedimiento para la preparación de los medios de cultivo se presenta en la figura 57.

Tabla 22. Composición del Medio de Cultivo de Ravot *et al.* (1995) para bacterias sulfatorreductoras.

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
KCl	0.1 g
Extracto de levadura	1.0 g
Resarzurina (0.1%)	1 ml
Solución de oligoelementos de Balch	10 ml
Cisteína	0.5 g
Agua destilada	1000 ml

Tabla 23. Composición del Medio de Cultivo de Balch *et al.* (1979) para arqueas metanogénicas.

Sustancia	Cantidad
Solución mineral 1	50 ml
Solución mineral 2	50 ml
Solución de oligoelementos	10 ml
Solución de vitaminas	10 ml
Solución de NiCl <sub>2</sub> (5.0 mg/100 ml)	1ml
Solución de FeSO <sub>4</sub> (0.2%)	1ml
Resarzurina (0.1%)	1ml
Peptona de caseína	1 g
Extracto de levadura	1 g
Cisteína	0.5 g
Agua destilada	1000 ml

En el caso de las arqueas metanogénicas, la solución mineral 1 contenía por litro: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.0 g. La solución mineral 2 tenía una composición por litro: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 6.0 g; MgSO<sub>4</sub>-7 H<sub>2</sub>O, 2.6 g; CaCl<sub>2</sub>-2 H<sub>2</sub>O, 0.16 g.

Tabla 24. Composición de la solución de vitaminas de Balch *et al.* (1979).

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Biotina (vit. H)	2.0 mg
Ácido fólico	2.0 mg
Piridoxina-HCl	10.0 mg
Tiamina-HCl (vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg
Riboflavina (vit. B <sub>2</sub> )	5.0 mg
Ácido nicotínico	5.0 mg
DL-pantotenato de calcio	5.0 mg
Cianocobalamina (Vit. B <sub>12</sub> )	0.1 mg
Ácido p-aminobenzoico (PABA)	5.0 mg
Ácido lipoico	5.0 mg
Agua destilada	1000 ml

Tabla 25. Composición de la solución de oligoelementos de Balch *et al.* (1979).

Sustancia	Cantidad
Ácido nitriloacético	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> -7 H <sub>2</sub> O	3.0 g
MnSO <sub>4</sub> -2 H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaCl	1.0 g
FeSO <sub>4</sub> -7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> -6 H <sub>2</sub> O	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> -2 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Zn(Cl <sub>2</sub> )/SO <sub>4</sub>	0.1 g
CuSO <sub>4</sub> -5 H <sub>2</sub> O	0.01 g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.01 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2 H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agua destilada	1000 ml

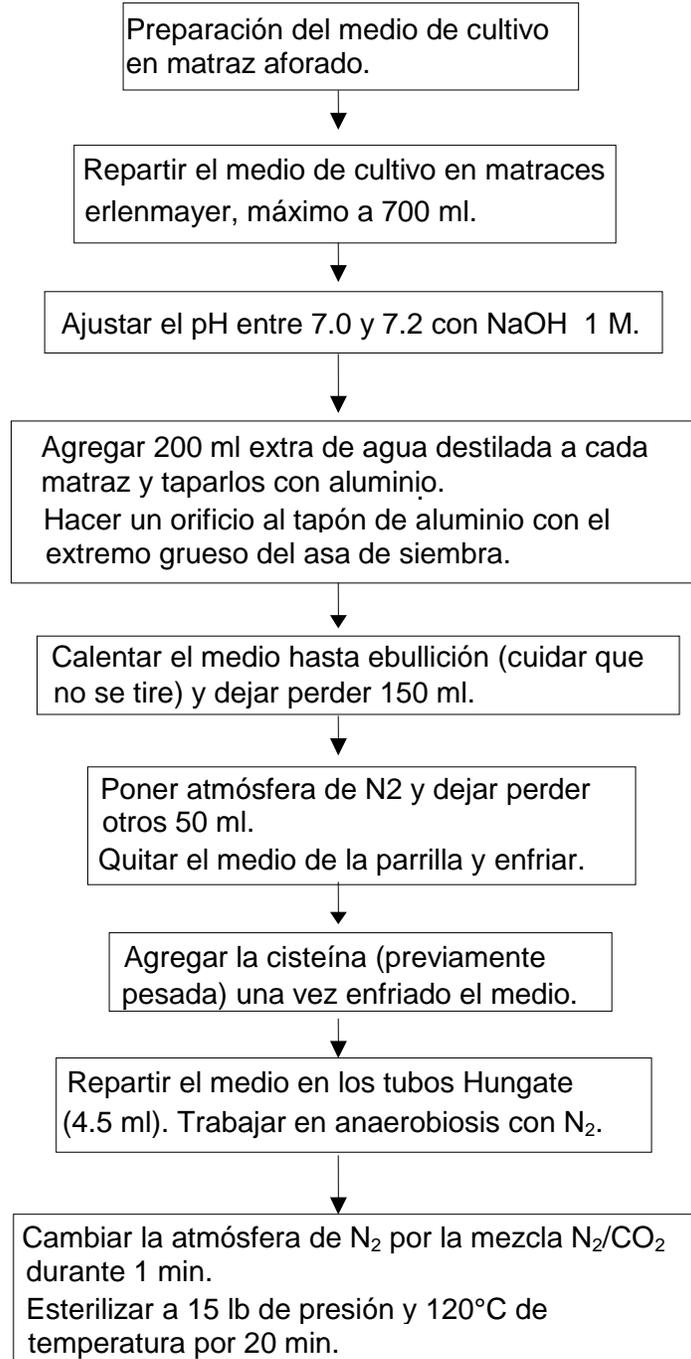


Figura 57. Preparación de los medios de cultivo.

## 2. Técnicas moleculares.

Extracción del ADN mediante el Kit Ultra Clean Soil DNA (MoBio, Solana Beach, Calif).

1. Debido a que la muestra de sedimento tiene un alto contenido de agua, tomar la solución Bead de los tubos y pasarla a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 ml. En el tubo vacío pesar 1.5 g del sedimento húmedo. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto, eliminar el sobrenadante con una punta de pipeta.

2. Adicionar de nuevo al tubo la solución Bead. Agitar en vortex durante 10 segundos.

3. Adicionar 60 µl de la solución S1. Agitar en vortex durante 4 segundos. Calentar a 70°C durante 5 minutos.

4. Adicionar 200 µl de la solución IRS. Agitar en vortex por 10 segundos. Calentar a 70°C durante 5 minutos. Agitar en vortex durante 10 segundos. Calentar a 70°C durante 5 minutos. Agitar horizontalmente en vortex durante 10 segundos.

5. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto. Transferir con una pipeta el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio de 1.50 ml. Deben de obtenerse aproximadamente entre 400-450 µl del sobrenadante.

6. Adicionar 250 µl de la solución S2. Agitar en vortex durante 5 segundos. Incubar en hielo frappe (4°C) durante 5 minutos.

7. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio de 2.0 ml.

8. Adicionar 1.3 ml de la solución S3. Agitar en vortex durante 5 segundos.
9. Adicionar 700  $\mu$ l a un tubo con filtro. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto. Decantar el líquido y limpiar la boca del tubo. Adicionar otros 700  $\mu$ l del sobrenadante al tubo con filtro. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto. Repetir el proceso hasta que todo el sobrenadante haya pasado a través del filtro.
10. Adicionar 30  $\mu$ l de la solución S4. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto.
11. Decantar el líquido. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto.
12. Colocar cuidadosamente el filtro en un tubo Eppendorf limpio de 2.0 ml. Adicionar 50  $\mu$ l de la solución S5 al centro de la columna.
13. Esperar 3 minutos. Centrifugar a 12 500 rpm durante 1 minuto.
14. Descartar el filtro. Conservar el extracto a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Tabla 26. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen 16S rARN de las bacterias sulfatorreductoras.

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada y esterilizada	38 µl
PCR buffer 10x	5 µl
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) 50 mM	2.5 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	1.0 µl
Primer BSR 385-F 10 pmol	1.0 µl
Primer Univ 907-R 10 pmol	1.0 µl
Taq polimerasa 5 U	0.5 µl
ADN extraído	1.0 µl

Tabla 27. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen 16S rARN de las arqueas metanogénicas.

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada y esterilizada	38 µl
PCR buffer 10x	5 µl
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) 50 mM	2.5 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	1.0 µl
Primer Arch 21-F 10 pmol	1.0 µl
Primer Univ 907-R 10 pmol	1.0 µl
Taq polimerasa 5 U	0.5 µl
ADN extraído	1.0 µl

## Purificación del producto de PCR. Kit de purificación QIAquick (Qiagen)

1. Colocar una columna spin en un tubo de colecta de 2 ml.
2. Colectar 90  $\mu$ l de muestra amplificada + 450  $\mu$ l de buffer PB. (5 volúmenes del buffer PB por un volumen de la muestra de PCR).
3. Mezclar con la mano. No vortex.
4. Centrifugar a 13000 r.p.m. a 22°C durante 1 minuto.
5. Descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo. Adicionar 750  $\mu$ l del buffer PE. **NOTA:** el buffer PE se prepara antes de utilizarlo adicionando 24 ml de etanol (96-100%) al frasco.
6. Centrifugar a 13000 r.p.m. a 22°C durante 1 minuto.
7. Descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo. Centrifugar nuevamente a 13000 r.p.m. a 22°C durante 1 minuto.
8. Descartar el líquido y colocar la columna en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.
9. Adicionar 50  $\mu$ l de buffer EB al centro de la columna. Dejar incubar a temperatura ambiente 10 minutos. **NOTA:** para concentrar la cantidad de ADN amplificado, se adicionan 30  $\mu$ l de buffer EB en lugar de los 50  $\mu$ l.
10. Centrifugar a 13000 r.p.m. a 22°C durante 1 minuto.
11. Descartar la columna. Conservar el líquido a -20°C.

Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP).

Tabla 28. Mezcla de reacción utilizada en el RFLP del producto amplificado de las bacterias sulfatorreductoras con las enzimas *Bfal* y *HaeIII* (New England BioLabs).

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada y esterilizada	6.0 µl
Buffer 4 10x	3.0 µl
Enzima <i>Bfal</i> 5 U	1.0 µl
Muestra del producto amplificado	20.0 µl
Total	30.0 µl
Agua desionizada y esterilizada	6.5 µl
Buffer 2 10x	3.0 µl
Enzima <i>HaeIII</i> 5 U	0.5 µl
Muestra del producto amplificado	20.0 µl
Total	30.0 µl

Tabla 29. Mezcla de reacción utilizada en el RFLP del producto amplificado de las arqueas metanogénicas con las enzimas *RsaI* y *AluI* (New England BioLabs)..

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada y esterilizada	6.5 µl
Buffer 1 10x	3.0 µl
Enzima <i>RsaI</i> 5 U	0.5 µl
Muestra del producto amplificado	20.0 µl
Total	30.0 µl
Agua desionizada y esterilizada	6.5 µl
Buffer 2 10x	3.0 µl
Enzima <i>AluI</i> 5 U	0.5 µl
Muestra del producto amplificado	20.0 µl
Total	30.0 µl

## 14. REFERENCIAS

- Abram, J. W. & D. B. Nedwell. 1978. Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulphate reduction in anaerobic saltmarsh sediment. *Archives of Microbiology*. 117: 93-97.
- Algarsamy, R. 1991. Organic carbon in the sediments of Mandovi Estuary, Goa. *Indian Journal of Marine Sciences*. 20(3): 221-222
- Al-Ghadban, A. N., P. G. Jacob & F. Abdali. 1994. Total organic carbon in the sediments of the Arabian Gulf and need for biological productivity investigations. *Marine Pollution Bulletin*. 28: 356-362
- Aller, R. C. & J. Y. Yingst. 1980. Relationships between microbial distributions and the anaerobic decomposition of organic matter in surface sediments of Long Island Sound, USA. *Marine Biology*. 59: 29-42.
- Aller., R. C., N. E. Blair, Q. Xia & P. D. Rude. 1996. Remineralization rates, recycling and storage of carbon in Amazon shelf sediments. *Continental Shelf Research*. 16: 753-786.
- Alongi, D. M., F. Tirendi, P. Dixon, L. A. Trott & G. J. Brunskill. 1999. Mineralization of organic matter in intertidal sediments of a tropical semi-closed delta. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 48: 451-467.
- Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key & A. Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 614-623.
- Amann, R. I., W. Ludwig & K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59: 143-169.
- APHA, AWWA, WPCF, (Eds). 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D. C. United States: American Public Health

Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (APHA, AWWA and WPCF). 957 p.

Aravalli, R. N., S. Qunxin & R. A. Garrett. 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 190-194.

Atlas, R. M. & R. Bartha. 2001. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Ed. Addison-Wesley. España. 677.

Avelino, G., F. López, M. Gallegos & E. Angeles. 1993. Aspectos de la productividad primaria de un manglar del estado de Chiapas, México. *XII Congreso Mexicano de Botánica*. Ciudad de México. 29.

Avelino, G. & J. F. S. López. 1992. Evaluación de la biomasa anual del manglar de Chantuto-Panzacola, Chiapas. *III Reunión Nacional Alejandro Villalobos*. Ciudad de México. 2.

Avery, G. B., R. D. Shannon, J. R. White, C. S. Martens & M. J. Alperin. 1999. Effect of seasonal changes in the pathways of methanogenesis on the  $d^{13}C$  values of pore water methane in a Michigan peatland. *Global Biogeochemical Cycles*. 13: 475-484.

Bak, F. & F. Widdel. 1986. Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Archives of Microbiology*. 146: 177-180.

Balba, M. T. & D. B. Nedwell. 1982. Microbial metabolism of acetate, propionate and butyrate in anoxic sediment from Colne Point saltmarsh, Essex, U. K. *Journal of General Microbiology*. 128: 1415-1422.

Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese & R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*. 43: 260-296.

Banat, I. M. & D. B. Nedwell. 1983. Mechanisms of turnover of C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> fatty acids in high-sulphate and low-sulphate anaerobic sediments. *FEMS Microbiology Letters*. 17: 107-110.

- Barrera-Escorcia, G., I. Wong-Chang, S. Sobrino F., X. Guzmán-García, F. Hernández-Galindo & F. Saavedra-Villeda. 1990. Evaluación microbiológica de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, en el ciclo 1994-1995. *Hidrobiológica*. 9: 125-134.
- Battersby, N. S., S. J. Malcom, C. M. Brown & S. O. Stanley. 1985. Sulphate reduction in oxic and sub-oxic North East Atlantic sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 31: 225-228.
- Becerra, T. N. & A. V. Botello. 1995. Bacterias coliformes totales, fecales y patógenas en el sistema lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas, México. *Hidrobiológica*. 5: 87-94.
- Bedard, C. & R. Knowles. 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological Reviews*. 53: 68-84.
- Blair, N. E. & R. C. Aller. 1995. Anaerobic methane oxidation on the Amazon shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 59: 3707-3715.
- Blum, L. K., A. L. Mills, J. C. Zieman & R. T. Zieman. 1988. Abundance of bacteria and fungi in seagrass and mangrove detritus. *Marine Ecology Progress Series*. 42: 73-78.
- Boone, D. R., W. B. Whitman & P. Rouviere. 1993. Diversity and Taxonomy of Methanogens. J. G. Ferry. *Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Chapman and Hal. New York. 35-80.
- Boschker, H. T. S., W. de Graaf, M. Köster, L. A. Meyer-Reil & T. E. Cappenberg. 2001. Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 97-103.
- Boström, B., M. Jansson & A. Forsberg. 1982. Phosphorus release from lake sediments. *Archives of Hydrobiology*. 18: 5-60.

Brandt, K. K., F. Vester, A. Jensen & K. Ingvorsen. 2001. Sulfate reduction dynamics and enumeration of sulfate-reducing bacteria in hypersaline sediments of the Great Salt Lake (Utah, USA). *Microbial Ecology*. 41: 1-11.

Brooks Avery, G. J., R. D. Shannon, J. R. White, C. S. Martens & M. J. Alperin. 2002. Controls on methane production in a tidal freshwater estuary and a peatland: methane production via acetate fermentation and CO<sub>2</sub> reduction. *Biogeochemistry*. 100: 1-19.

Burdige, D. J. 2002. Sediment pore waters. D. Hansell & C. Carlson. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press. New York, United States of America. 611-663.

Calva, B. L. G. & A. V. Botello. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Sontecomapan Lagoon, Veracruz, Mexico. *Hidrobiológica* 9(1): 45-52

Calva, B. L. G. & R. Torres-Alvarado. 2000. Distribución de carbohidratos, carbono y nitrógeno orgánico en sedimentos de tres lagunas costeras del Golfo de México. *Hidrobiológica*. 10: 101-114.

Canfield, D. E. 2005. The iron and manganese cycles. A. J. Southward, P. A. Tyler, C. M. Young & L. A. Fuiman. *Advances in Marine Biology*. Elsevier Inc. 269-312.

Canfield, D. E., B. Thamdrup & J. W. Hansen. 1993. The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: Fe reduction, Mn reduction and sulfate reduction. *Geochemica et Cosmochimica Acta*. 57: 3867-3883.

Canfield, D. E., E. Kristensen & B. Thamdrup. 2005a. The methane cycle. A. Southward, P. A. Tyler, C. M. Young & L. A. Fuiman. *Advances in Marine Biology. Aquatic Geomicrobiology*. Elsevier Inc. United Kingdom. 383-418.

Canfield, D. E., E. Kristensen & B. Thamdrup. 2005b. The sulfur cycle. A. Southward, P. A. Tyler, C. M. Young & L. A. Fuiman. *Advances in Marine Biology. Aquatic Geomicrobiology*. Elsevier. United Kingdom. 314-381

- Capone, D. G. & R. P. Kiene. 1988. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnology and Oceanography*. 33: 725-749.
- Cappenberg, T. E. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a freshwater lake. I. Inhibition experiments. *Antonie Van Leeuwenhoek. Journal of Microbiological Series*. 40: 297-306.
- Cappenberg, T. E. 1975. A study of mixed continuous cultures of sulfate-reducing and methane-producing bacteria. *Microbial Ecology*. 2: 60-72.
- Cappenberg, T. E. & R. A. Prins. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. II. Experiments with <sup>14</sup>C-labeled substrates. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology Serol*. 40: 457-469.
- Caraco, N. F., J. J. Cole & G. E. Likens. 1989. Evidence for sulphate-controlled phosphorus released from sediments of aquatic systems. *Nature*. 341: 316-318.
- Castro, H., K. R. Reddy & A. Ogram. 2002. Composition and function of sulfate-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 6129-6137.
- Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 193-202.
- Conrad, R., H. Schütz & M. Babbel. 1987. Temperature limitation of hydrogen turnover and methanogenesis in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiological Ecology*. 45: 281-289.
- Contreras, F., A. García & O. Castañeda. 1992. Hidrología, nutrientes y productividad primaria en el sistema lagunar-estuarino de Carretas-Pereyra, Chiapas, México. *Universidad y Ciencia*. 9: 43-52.

- Cord-Ruwisch, R. 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 1: 2-10.
- Crill, P. M. & C. S. Martens. 1986. Methane production from bicarbonate and acetate in an anoxic marine sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 50: 2089-2097.
- Darnell, M. R. 1967. Organic detritus in relation to the estuarine ecosystem. G. H. Lauff. *Estuaries*. A. A. A. S. United States. 376-382.
- Day, J. H. 1980. What is an estuary? *Southern Africa Journal Science*. 76: 198-216
- Day, J., C. W., F. Ley-Lou, R. Day & A. M. Navarro. 1987. The productivity and composition of mangrove forests, Laguna de Términos, México. *Aquatic Botany*. 27: 267-284.
- DeLaune, R. D., I. Devai, C. R. Crozier & P. Kelle. 2002. Sulfate reduction in Louisiana Marsh soils of varying salinities. *Communities Soil Science Plant Analyses*. 33: 79-94.
- Dévai, I., K. R. Reddy, R. D. Delaune & D. A. Graetz. 1996. Sulfate reduction and organic matter decomposition in a wetland soil and lake sediment. *Acta Biologica Debrecina Oecol. Hung*. 6: 13-23.
- Devereux, R., M. E. Hines & D. A. Stahl. 1996a. S cycling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16s rRNA sequence comparisons. *Microbiology Ecology*. 32: 283-292.
- Devereux, R., M. R. Winfrey, M. R. Winfrey & D. A. Stahl. 1996b. Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *FEMS Microbial Ecology*. 20: 23-31.
- De Wit, R. 2003. Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons. *ELOISE Workshop: Demands at the European and Global Level*. Goes (The Netherlands). 1-8.

- De Wit, R., L. J. Stal, B. A. Lomstein, R. A. Herbet, H. V. Gemerden, P. Viaroli, V. U. Cecherelli, F. Rodríguez-Valera, B. Schaub, B. Bartoli, D. T. Welsh, A. Donnelly, A. Cienfuentes, A. Antón, K. Finster, L. B. Nielsen, A. G. U. Pedersen, A. T. Neubeurer, M. A. Colangelo & S. K. Heijs. 2001. ROBUST: the role of buffering capacities in stabilising coastal lagoon ecosystems. *Continental Shelf Research*. 21: 2021-2041.
- Dicker, H. J. & D. W. Smith. 1985. Effects of organic amendments of sulfate reduction activity, H<sub>2</sub> consumption, and H<sub>2</sub> production in salt marsh sediments. *Microbial Ecology*. 11: 299-315.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers & F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- El-Sammak, M. 1999. Model of sediments movement in Montazah, a semi-enclosed bay, Alexandria, Egypt. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63(5): 618-624
- Engler, R. M., J. M. Brannon, J. Rose & G. Bigham. 1977. A practical selective extraction procedure for sediment characterization. T. F. Yen. *Chemical Marine Sedimentology*. 163-171.
- Eyre, B. 1998. Transport, retention and transformation of material in Australian Estuaries. *Estuaries*. 21: 540-551.
- Fey, A. & R. Conrad. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the Archaeal community in methanogenic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11): 4790-4797
- Ficker, M., K. Krastel, S. Orlicky & E. Edwards. 1999. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5576-5585.
- Flores-Verdugo, F. J. (1985) Aporte de materia orgánica por los principales productores primarios a un ecosistema lagunar-estuarino de boca efímera. En:

*Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, p. 157.

Forney, L. J., X. Zhou & C. J. Brown. 2004. Molecular microbial ecology: land one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 210-220.

Frankignoulle, M. & J. Middelburg. 2002. Biogases intidal European estuaries: the BIOGEST proyect. *Biogeochemistry*. 59: 1-14.

Franklin, M. J., J. W. William & W. B. Whitman. 1988. Populations of methanogenic bacteria in a Georgia salt marsh. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1151-1157.

Fukui, M., J. Suh, Y. Yonezawa & Y. Urushigawa. 1997. Major substrates for microbial sulfate reduction in the sediments of Ise Bay, Japan. *Ecology Research*. 12: 201-209.

Garcia, J. L. 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiological Reviews*. 87: 297-308.

García, N. A. & O. Castañeda. 1992. Estudios básicos ecológicos en dos lagunas costeras del estado de Chiapas, México. *IX Congreso Nacional de Oceanografía*. 110.

García, N. A. & O. Castañeda. 1994. Hidrología, nutrientes y productividad primaria en dos sistemas costeros del estado de Chiapas, México. *Revista de Investigaciones Marinas*. 15: 171-190.

Gattuso, J. P., M. Frankignoulle & A. Wollast. 1998. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29: 405-434.

Gaudette, H., W. Fligh, L. Toner & D. Folger. 1974. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *Journal of Sediments and Petrology* 44: 249-253.

Gibson, G. R. 1990. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 69: 769-797.

Gibson, G. R., G. T. Macfarlane & J. H. Cummings. 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *Journal of Applied Bacteriology*. 65: 103-111.

González, A., N. Hierro, M. Poblet, A. Mas & J. M. Guillamon. 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 295-304

Gould, R. N., J. K. Gundersen, B. B. Jørgensen, N. P. Revsbech & H. D. Schulz. 1994. Diffusive and total oxygen uptake of deep-sea sediments in the eastern South Atlantic Ocean: *in situ* and laboratory measurements. *Deep-Sea Research*. 41: 1767-1788.

Gray, J. P. & R. P. Herwig. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4049-4059.

Gunnarsson, L. A. H. & P. H. Rönnow. 1982. Interrelationships between sulfate reducing and methane producing bacteria in coastal sediments with intense sulfide production. *Marine Biology*. 69: 121-128.

Hales, B., C. Edwards, D. A. Ritchie, G. H. Hall, R. Pickup & J. R. Saunders. 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 668-675.

Hamilton, W. A. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annual Review Microbiology*. 39: 195-217.

Hartl, D. L. & E. W. Jones. 2005. *Genetics. Analysis of Genes and Genomes*. Jones and Bartlett Publishers. Unites States of America. 854.

- Hedges, J. I., J. A. Baldock, Y. Gélinas, C. T. Lee, M. L. Peterson & S. G. Wakeham. 2002. The biochemical and elemental compositions of marine plankton: a NMR perspective. *Marine Chemistry*. 78: 47-63.
- Higgins, I. J., D. J. Best, R. C. Hammond & D. Scott. 1981. Methane-oxidizing microorganisms. *Microbiological Reviews*. 45: 556-590.
- Hildrew, A. G. 1994. Food webs and species interactions. P. Calow. *The Rivers Handbook. Hydrological and Ecological Principles*. Blackwell Scientific Publications. United States of America. 309-329.
- Hines, M. E. & J. D. Buck. 1982. Distribution of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in near-shore sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 447-453.
- Hines, M. E., D. A. Bazylinski, J. B. Tugel & W. B. Lyons. 1991. Anaerobic microbial biogeochemistry in sediments from two basins in the Gulf of Maine: evidence for iron and manganese reduction. *Estuarine and Coastal Shelf Science*. 32:313-324
- Hiraishi, A., Y. Kamagata & K. Nakamura. 1995. Polymerase chain reaction amplification and restriction length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79: 523-529
- Hodson, R. E., R. R. Christian & A. E. Maccubbin. 1984. Lignocellulose and lignin in the salt-marsh grass *Spartina alterniflora*: initial concentrations and short-term, post-depositional changes in detrital matter. *Marine Biology*. 81: 1-7.
- Holt, J. G., N. K. R., P. S. H. A., J. S. T. & W. S. T. 1994. *The methanogens. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William & Wilkins. Baltimore, U.S.A. 719-735.
- Horn, M. A., C. Matthies, K. Küsel, A. Schramm & H. L. Drake. 2003. Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acid peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 74-83.

- Howarth, R. W. 1978. A rapid and precise method for determining sulfate in seawater, estuarine waters, and sediment pore waters. *Limnology and Oceanography*. 23: 1066-1069.
- Howarth, R. W. 1993. Microbial processes in salt-marsh sediments. T. E. Ford. *Aquatic Microbiology*. Blackwell Scientific Publications. Boston. 239-260.
- Howarth, R. W. & S. Merkel. 1984. Pyrite formation and the measurement of sulfate reduction in salt marsh sediments. *Limnology and Oceanography*. 29: 598-608.
- Howarth, R. W. & J. M. Teal. 1979. Sulfate reduction in a New England salt marsh. *Limnology and Oceanography*. 24: 999-1013.
- Howes, B. J., J. W. H. Dacey & G. M. King. 1984. Carbon flow through oxygen and sulfate reduction pathways in salt marsh sediments. *Limnology and Oceanography*. 29: 1037-1051.
- Howes, B. L. 1985. Effects of sampling technique on measurements of porewater constituents in salt marsh sediments. *Limnology and Oceanography*. 30: 221-227.
- Howes, B. L., R. W. Howarth, J. M. Teal & I. Valiela. 1981. Oxidation-reduction potentials in a salt marsh. Spatial patterns and interactions with primary production. *Limnology and Oceanography*. 26: 350-360
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. J. R. Norris & D. W. Ribbons. *Methods in Microbiology*. Academic Press. New York, United States. 117-132.
- INE-SEMARNAP. 1999. *Programa de Manejo Reserva de la Biósfera La Encrucijada*. Instituto Nacional de Ecología-Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México. 183 p.
- Isa, Z., S. Grusenmeyer & W. Verstraete. 1986. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: microbiological aspects. *Applied and Environmental Microbiology*. 51: 580-587.

- Jickells, T. D. & J. E. Rae. 1997. *Biogeochemistry of Intertidal Sediments*. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain. 193.
- Jones, W. J. & M. J. B. Paynter. 1980. Populations of methane-producing bacteria and *in vitro* methanogenesis in salt marsh and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 864-871.
- Jørgensen, B. B. 1977. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnology and Oceanography*. 22: 814-832.
- Jørgensen, B. B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea-bed- the role of sulphate-reduction. *Nature*. 296: 643-645.
- Jørgensen, B. B. 2000. Bacteria and marine biogeochemistry. M. Zabel. *Marine Geochemistry*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 173-207.
- Jørgensen, B. B. & T. Fenchel. 1974. The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biology*. 24: 189-201.
- Kadam, P. C., S. H. Godbole & D. R. Ranade. 1989. Isolation of methanogens from Arabian sea sediments and their salt tolerance. *FEMS Microbiology Ecology*. 62: 343-348.
- Karl, D. M. & B. D. Tilbrook. 1994. Production and transport of methane in oceanic particulate organic matter. *Nature*. 368: 732-734.
- King, G. M. 1984. Utilization of hydrogen, acetate, and "noncompetitive" substrates by methanogenic bacteria in marine sediments. *Geomicrobiology Journal*. 3: 275-306.
- King, G. M. & W. J. Wiebe. 1980. Tracer analysis of methanogenesis in salt marsh soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 877-881
- King, G. M., P. Roslev & H. Skovgaard. 1990. Distribution and rate of methane oxidation in sediments of the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2902-2911.

- Knoppers, B. & B. Kjerfve. 1997. Coastal lagoons of Southeastern Brazil: physical and biogeochemical characteristics. G. M. E. Perillo, M. C. Piccolo & M. Pino-Quivira. *Estuaries of South America*. Springer. 35-66.
- Kohler, H. P., B. Ahring, C. Abella, K. Ingvorsen, H. Keweloh, E. Laczkó, E. Stupperich & F. Tomei. 1984. The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biology*. 24: 189-201.
- Kosiur, D. R. & A. L. Walford. 1979. Methane production and oxidation in Santa Barbara basin sediments. *Estuarine and Coastal Marine Science* 8: 379-385
- Kostka, J. E., B. Gribsholt, E. Petrie, D. Dalton, H. Skelton & E. Kristensen. 2002. The rates and pathways of carbon oxidation in bioturbated saltmarsh sediments. *Limnology and Oceanography*. 47: 230-240.
- Kotsyurbenko, O. R., K.-J. Chin, M. V. Glagolev, S. Stubner, M. V. Simankova, A. N. Nozhevnikova & R. Conrad. 2004. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology*. 6: 1159-1173.
- Kristjansson, J. K., P. Schönheit & R. K. Thauer. 1982. Different K<sub>2</sub> values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Archives of Microbiology*. 131: 278-282.
- Kuivila, K. M., J. W. Murray & A. H. Devol. 1988. Methane production in the sulfate-depleted sediments of two marine basins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 54: 403-411.
- Laanbroek, H. J. & N. Pfennig. 1981. Oxidation of short chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Archives of Microbiology*. 128: 330-335.
- Langmuir, D. 1971. Eh-pH determination. R. E. Conner. *Proceedings Sediments and Petrology*. Wiley-Interscience. United States. 653

- Lankford, R. R. 1977. Coastal lagoon of Mexico. Their origin and classification. M. Wiley. *Estuarine Processes*. Academic Press Inc. United States. 182-215.
- Lehninger, A. L. 1980. *Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona, España. 1117.
- Libes, S. M. 1992. *An Introduction to Marine Biochemistry*. 1992. John Wiley and Sons. USA. 670 p.
- Lidstrom, E. B. 1983. Methane consumption in Framvaren, an anoxic marine fjord. *Limnology and Oceanography*. 28: 1247-1251.
- Lidstrom, M. E. 2001. Aerobic methylotrophic prokaryotes. M. Dworkin, A. Balows, H. G. Trüper, W. Harder & K. H. Schleifer. *The Prokaryotes*. Springer. New York, United States of America. 37-45.
- Lovley, D. R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*. 55: 259-287.
- Lovley, D. R., D. F. Dwyer & M. J. Klug. 1982. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 1373-1379.
- Lovley, D. R. & M. J. Klug. 1983. Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1310-1315.
- Lovley, D. R. & J. G. Ferry. 1985. Production and consumption of H<sub>2</sub> during growth of *Methanosarcina* spp. on acetate. *Applied and Environmental Microbiology*. 49: 247-249.
- Lovley, D. R. & M. J. Klug. 1986. Model for distribution of sulfate reduction and methanogenesis in freshwater sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 50: 11-18.
- Ludwig, W. 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 225-236.

- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2003. *Brock's Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. New Jersey, United States of America. 543.
- Mah , R. A. & M. R. Smith. 1981. The methanogenic bacteria. H. S. P.S. Mortimer, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel. *The prokaryotes. A handbook on habitats isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag. New York. 948-977.
- Malty, L. 1994. Detritus processing. P. Calow. *The Rivers Handbook. Hydrological and Ecological Principles*. Blackwell Scientific Publications. United States of America. 331-353.
- Mann, K. H. 1982. *Ecology of Coastal Waters. A Systems Approach*. United States. 322 p.
- Márquez García, A. Z., L. G. C. Benítez & A. P. Rojas. 2006. Consideraciones batimétricas del Sistema Lagunar Carretas-Pereyra, Chiapas, México. *Hidrobiológica*. 16: 121-126.
- Martens, C. S. & R. A. Berner. 1974. Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science*. 185: 1167-1168.
- Mathrani, I. M. & D. R. Boone. 1985. isolation and characterization of a moderately halophilic methanogen from a solar saltern. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 140-143.
- McDowell, D. 1999. PCR: Factors affecting reliability and validity. G. C. Saunders & H. C. Parkes. *Analytical Molecular Biology. Quality and Validation*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK. 58-80.
- Mechalas, B. J. 1974. Pathways and environmental requeriments for biogenic gas production in the ocean. I. R. Kaplan. *Natural Gases in Marine Sediments*. Plenum Press. 11-25.
- Miller, W. L., C. M. Brown, T. H. Pearson & S. O. Stanley. 1979. Some biologically important low molecular weight organic acids in the sediments of Loch Eil. *Marine Biology*. 50: 375-383.

- Mitsch, W. J. & J. G. Gosselink. 2000. *Wetlands*. Van Nostrand Reinhold. New York. 539.
- Mohanraju, R. & R. Natarajan. 1992. Methanogenic bacteria in mangrove sediments. *Hydrobiologia*. 247: 187-193.
- Mohanraju, R., B. S. Rajagopal & L. Daniels. 1997. Isolation and characterization of a methanogenic bacterium from mangrove sediments. *Journal of Marine Biotechnology*. 5: 147-152.
- Moran, M. A., R. Benner & R. E. Hudson. 1989. Kinetics of microbial degradation of vascular plant material in two wetlands ecosystems. *Oecologia*. 79: 158-167.
- Morán-Silva, A., L. A. M. Franco, R. Chávez-López, J. Franco-López, C. M. Bedia-Sánchez, F. C. E., G. G. M., N. J. Brown-Peterson & M. S. Peterson. 2005. Seasonal and spatial patterns in salinity, nutrients, and chlorophyll *a* in the Alvarado Lagoonal System, Veracruz, Mexico. *Gulf and Caribbean Research*. 17: 133-143.
- Morris, A. W. & J. P. Riley. 1966. The bromide/chlorinity and sulphate/chlorinity ratio in sea water. *Deep-Sea Research*. 13: 699-705.
- Mountfort, D. O. & R. A. Asher. 1979. Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of *Methanosarcina barkeri* Strain DM. *Applied and Environmental Microbiology*. 37: 670-675.
- Mountfort, D. O. & R. A. Asher. 1981. Role of sulfate reduction versus methanogenesis in terminal carbon flow in polluted intertidal sediment of Waimea Inlet, Nelson, New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*. 42(2): 252-258
- Mountfort, D. O., R. A. Asher, E. L. Mays & J. M. Tiedje. 1980. Carbon and electron flow in mud and sandflat intertidal sediments at Delaware Inlet, Nelson, New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 686-694.
- Munson, M. A., D. B. Nedwell & T. M. Embley. 1997. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4729-4733.

- Nair, N. B., M. Arunachalam, P. K. A. Azis, K. K. Kumar & K. Dharmaraj. 1983. Ecology of Indian estuaries. Distribution of organic carbon in the sediments of the sediments of the Ashtamudi Estuary. *Indian Journal of Marine Sciences*. 12(4): 225-227
- NCSS. 2000. Number Cruncher Statistical System. Statistical Analysis and Graphics Software.
- Nedwell, D. B. & J. W. Abram. 1978. Bacterial sulfate reducing in relation to sulfur geochemistry in two contrasting areas of salt marsh sediment. *Estuarine and Coastal Marine Science*. 6: 341-351.
- Nelson, D. C. & W. H. Jannasch. 1983. Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Archives of Microbiology*. 136: 262-269.
- Neue, H. U., J. L. Gaunt, Z. P. Wang, P. Becker-Heidmann & C. Quijano. 1997. Carbon in tropical wetlands. *Geoderma*. 79: 163-185
- Nichols, M. M. & R. B. Biggs. 1985. Estuaries. R. A. Davies. *Coastal Sedimentary Environments*. Springer-Verlag. New York, United States. 77-91.
- Odum, E. P. 1982. *Ecología*. Editorial Interamericana. México. 639 p.
- Odum, W. E. & E. J. Heald. 1972. Trophic analyses of an estuarine mangrove community. *Bulletin Marine Science*. 22: 671-738.
- Olliver, B. M., R. A. Mah, J. L. Garcia & D. R. Boone. 1986. Isolation and characterization of *Methanogenium bourgense* sp. nov. *International Systematic Bacteriology*. 36: 297-301.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace & D. A. Stah. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*. 40: 337-365.
- Oremland, R. S. 1975. Methane production in shallow-water, tropical marine sediments. *Applied Microbiology*. 30: 602-608.

Oremland, R. S., L. M. Marsh & S. Polcin. 1982. Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature*. 296: 143-145.

Oremland, R. S. & S. Polcin. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 1270-1276.

Oren, A. 1988. Anaerobic degradation of organic compounds at high salt concentrations. *Antonie van Leeuwenhoek*. 54: 267-277.

Ortega, B. R., S. Díaz-Ruiz & O. Pérez. 1998. Ictiofauna de dos lagunas costeras tropicales del sur del Golfo de Tehuantepec. *VI Congreso Nacional de Ictiología*. Túxpam, Veracruz.

Paerl, H. W. 1975. Bacterial uptake of dissolved organic matter in relation to detrital aggregation in marine and freshwater systems. *Limnology and Oceanography*. 19: 966-972.

Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton & P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79 (2): 361-382

Parkes, R. J., G. R. Gibson, I. Mueller-Harvey, W. J. Buckingham & R. A. Herebert. 1989. Determination of the substrates for sulphate-reducing bacteria within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *Journal of General Microbiology*. 135: 175-187.

Patrick, W. H., R. P. Gambrell & S. P. Faulkner. 1996. Redox measurements of soils. *Methods of Soils Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. United States of America. 1255-1273.

Patrick, W. H. J. & A. Jugsujinda. 1995. Sequential reduction and oxidation of inorganic nitrogen, manganese, and iron in flooded soil. *Soil Scientific Society American Journals*. 56: 1071-1073.

Patrick, W. H. J. & R. A. Khalid. 1974. Phosphate release and sorption by soils and sediments: effect of aerobic and anaerobic conditions. *Science*. 186: 53-55.

Pérez, G. N., V. V. Vega & F. Gutiérrez. 1998. Variación estacional de la comunidad fitoplanctónica del sistema lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas, México. *VII Congreso Latinoamericano de Botánica y XIV Congreso Mexicano de Botánica*. Ciudad de México.

Pérez, G. N., V. Vega & F. Gutiérrez. 1999. Caracterización anual fitoplanctónica del sistema lagunar-estuarino de Carretas-Pereyra, Chiapas, México. *3er. Congreso Mexicano de Ficología*. La Paz, Baja California Sur.

Pérez-González, M. L. & F. D. J. Morales-Manilla. 1985. *Investigación sobre metanogénesis en sedimentos de un ambiente costero asociado a la Laguna de Términos, Campeche*. Maestría. UNAM. México, D. F. 115.

Perillo, G. M. E. 1995. Definition and geomorphology classifications of estuaries. G. M. E. Perillo. *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*. Elsevier Science. Amsterdam. 17-47.

Peters, V. & R. Conrad. 1996. Sequential reduction processes and initiation of CH<sub>4</sub> production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 371-382.

Pfennig, N., F. Widdel & H. G. Truper. 1981. The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows & H. G. Schlegel. *The Prokaryotes. A handbook on habitats isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag. New York. 926-940.

Phelps, T. J. & J. G. Zeikus. 1985. Effect of fall turnover on terminal carbon metabolism in Lake Mendota sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:1285-1291

Pickard, G. L. 1963. *Descriptive physical oceanography*. Pergamon Press. New York, USA.

- Pinet, P. R. 2003. *Invitation to Oceanography*. Jones & Bartlett Publishers. Boston, UNited States of America. 555.
- Preston, M. R. & P. Prodduturu. 1992. Tidal variations of particulate carbohydrates in the Mersey Estuary. *Estuarine and Coastal Shelf Science*. 34: 37-48
- Pritchard, D. W. 1967. What is an estuary: physical viewpoint. G. H. Lauff. *Estuaries*. American Association for the Advancement of Science. Washington, D. C. 83-99.
- Purdy, K. J., M. A. Munson, D. B. Nedwell & T. M. Embley. 2002. Comparison of the molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of UK estuary. *FEMS Microbiology Ecology*. 39: 17-21.
- Purdy, K. J., D. B. Nedwell, T. M. Embley & S. Takii. 2001. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 165-168.
- Quintero, B. R., R. García, A. I. Vega & E. Barba. 2000. Distribution and density of macrocrustaceans of Chantuto-Panzacola lagoon in Chiapas, Mexico. *The Crustacean Society 2000 Summer Meeting*. Puerto Vallarta, México.
- Ramamurthy, T., R. Mohanraju & R. Natarajan. 1990. Distribution and ecology of methanogenic bacteria in mangrove sediments of Pichavaram, east coast of India. *Indian Journal of Marine Science*. 19: 269-273.
- Ravot, G., B. Ollivier, M. Margot, M. L. Fardeau, K. C. Patel, G. Prensier, A. Egan & J. L. García. 1995. *Thermotoga elfii* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 308-314.
- Rico-Gray, V. 1981. *Rhizophora harrisonii* (Rhizophoraceae), un nuevo registro de las costas de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 41: 163-165.
- Risatti, J. B., W. C. Capman & D. A. Stahl. 1994. Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91: 10173-10177.

- Ritchie, D. A., C. Edwards, I. M. McDonald & J. C. Murrell. 1997. Detection of methanogens and methanotrophs in natural environments. *Global Change Biology*. 3: 339-350
- Rivas, M. A. M. & G. E. Mendez. 1990. Bacteriología sanitaria del ostión de piedra *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854) procedente de la Bahía de Puerto Viejo, Mazatlán, Sinaloa. *VIII. Congreso Nacional de Zoología*. México. 59.
- Rivera-Arriaga, E. & G. Villalobos. 2001. The coast of Mexico: approaches for its management. *Ocean & Coastal Management*. 44: 729-756.
- Robb, F. B., R. Davies, R. Cross, C. Kenyon & C. H. Williams. 1979. Cellulolytic bacteria as primary colonizers of *Potamogeton pectinatus* L (Sago Pond weed) from brackish south temperate coastal lake. *Microbial Ecology*. 5: 157-177.
- Roden, E. E. & R. G. Wetzel. 1996. Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetlands sediments. *Limnology and Oceanography*. 41: 1733-1748.
- Rodríguez, P. C. 1994. Evaluación de metales en sedimentos, agua y biota de las lagunas Salada, El Llano y la Mancha, Veracruz, México. *Tesis de Licenciatura*. Fac. de Ciencias, UNAM. 99 p.
- Rueda, L. Q. 1993. Determinación de plaguicidas organoclorados en sedimentos y organismos (moluscos y peces) de lagunas costeras en el sureste de México. *Tesis de Licenciatura*. Fac. de Ciencias. UNAM. 78 p.
- Rueda, L., A. V. Botello & G. Díaz. 1997. Presencia de pesticidas organoclorados en dos sistemas lagunares de Chiapas, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 13: 55-61.
- Rullkötter, J. 2000. Organic matter: the driving force for early diagenesis. H. D. Schulz & M. Zabel. *Marine Geochemistry*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 129-172.

Sagemann, J., B. B. Jørgensen & O. Greeff. 1998. Temperature dependence and rates of sulfate reduction in cold sediments of Svalbard, Arctic Ocean. *Geomicrobiology Journal*. 15: 85-100.

Sahm, K., B. J. MacGregor, B. B. Jørgensen & D. A. Stahl. 1999. Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environmental Microbiology*. 1: 65-74.

Sai Ram, M., L. Singh & S. I. Alam. 1993. Effect of sulfate and nitrate on anaerobic degradation of night soil. *Biosource Technology*. 45: 229-232.

Sánchez, M. E. 1993. Comunidades características de macroalgas en lagunas costeras. M. G. Figueroa Torres, C. Álvarez Silva, A. Esquivel Herrera & E. Ponce Márquez. *Fisicoquímica y Biología de las Lagunas Costeras Mexicanas. Series Grandes Temas de la Hidrobiología I*. UAMI-Departamento de Hidrobiología. México. 46-50.

Sandbeck, K. A. & D. M. Ward. 1981. Fate of immediate methane precursors in low-sulfate, hot-spring algal-bacterial mats. *Applied and Environmental Microbiology*. 41: 775-782.

Santoyo, H. 1993. Fitoplancton y productividad de lagunas costeras. M. G. Figueroa Torres, C. Álvarez Silva, A. Esquivel Herrera & E. Ponce Márquez. *Fisicoquímica y Biología de las Lagunas Costeras Mexicanas. Series Grandes Temas de la Hidrobiología I*. UAMI-Departamento de Hidrobiología. México. 25-30.

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 Microbiology Ecology*. 22: 245-255.

Saunders, G. C. 1999. DNA Extraction. G. C. Saunders & H. C. Parkes. *Analytical Molecular Biology. Quality and Validation*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK. 29-46.

- Schaub, B. E. M. & H. V. Gernerden. 1996. Sulfur bacteria in sediments of two coastal ecosystems: the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost, France. *Hydrobiologia*. 329: 199-210.
- Schink, B. & J. G. Zeikus. 1980. Microbial methanol formation: a major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology*. 4: 387-389
- Schönheit, P., J. K. Kristjansson & R. K. Thauer. 1982. Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Archives of Microbiology*. 132: 285-288.
- Schulz, S., M. H. Nedwell & R. Conrad. 1997. Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology*. 22: 207-213.
- Scow K. M., E. Schwartz, M. J. Johnson & J. L. Macalady. 2001. Microbial biodiversity, measurement of. *Encyclopedia of Biodiversity*. 4: 177-190
- Segers, R. 1988. Methane production and methane consumption - a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*. 41: 23-51.
- Senior, E., E. B. Lindstrom, I. M. B. & D. B. Nedwell. 1982. Sulfate reduction and methanogenesis in the sediment of a saltmarsh on the east coast of the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 987-996.
- Smith, C. A. & E. J. Wood. 1998. *Biología Molecular y Biotecnología*. Addison-Wesley Iberoamericana. United States of America. 247 p.
- Smolders, A. & J. G. M. Roelofs. 1993. Sulphate-mediated iron limitation and eutrophication in aquatic ecosystems. *Aquatic Botany*. 46: 247-253.
- Sørensen, K. B. & D. E. Canfield. 2004. Annual fluctuations in stable sulfur isotope fractionation in Mariager Fjord are caused by sulfur disproportionation. *Geochemimica et Cosmochimica Acta*. 68: 503-515.

- Sørensen, J., D. Christensen & B. B. Jørgensen. 1981. Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*. 42: 5-11.
- Sørensen, J., B. B. Jørgensen & N. B. Revsbech. 1979. A comparison of oxygen, nitrate and sulfate respiration in coastal marine sediments. *Microbial Ecology*. 5: 105-115.
- Steengergen, C. L. M., J. P. R. A. Sweerts & T. E. Cappenberg. 1993. Microbial biogeochemical activities in lakes: stratification and eutrophication. T. E. Ford. *Aquatic Microbiology*. Blackwell Scientific Publications. Massachusetts, United States of America. 69-99.
- Stolz, J. F. 1986. Estructuras finas de estratificación de comunidades microbianas de la laguna Figueroa, Baja California, México. *MBI. Lectures in Biology*. 3: 23-38.
- Stolz, J. F. 1990. Distribución de microbios fototróficos en el piso laminado con un colchon microbial para laguna Figueroa, Baja California, México. *Biosystems*. 23: 345-358.
- Stolzy, L. H., D. D. Focht & H. Flühler. 1981. Indicators of soil aeration status. *Flora*. 171: 236-265.
- Strickland, J. D. H. & T. R. Parsons. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa, Canada. 310.
- Struwe, S. & A. Kjoller. 1989. Field determination of denitrification in water-logged forest soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 62: 71-78.
- Takii, S. & M. Fukui. 1991. Relative importance of methanogenesis, sulfate reduction and denitrification in sediments of the lower Tama river. *Bulletin of Japanese Society Microbial Ecology*. 6: 1-8.
- Tanner, R. S. 1989. Monitoring sulfate-reducing bacteria: comparison of enumeration media. *Journal of Microbiological Methods*. 10: 83-90.

- Teal, L, J. M. & J. Kanwisher. 1962. Gas exchange in a Georgia salt marsh. *Limnology and Oceanography*. 6: 388-399
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer & N. B. Ramsing. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (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
- Teske, A., N. B. , K. H. Ramsing, M. Fukui, J. Küver, B. Barker, B. Jørgensen & Y. Cohen. 1998. Sulfate-reducing bacteria and their activities in Cyanobacterial Mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2943-2951.
- Thode Andersen, S. & B. B. Jørgensen. 1989. Sulfate reduction and the formation of  $^{35}\text{S}$ -labelled  $\text{FeS}$ ,  $\text{FeS}_2$  and  $\text{S}^0$  in coastal marine sediments. *Limnology and Oceanography*. 34: 793-806.
- Thurman, H. W. 1997. *Introductory Oceanography*. Prentice Hall. New Jersey, United States. 544.
- Tölgyessy, P. 1993. The ecotoxicology of water pollutants. J. Tölgyessy. *Chemistry and biology of water, air and soil. Environmental aspects*. Elsevier. Checoslovaquia. 742-773.
- Torres-Alvarado, M. R. 2001. *Evolución cuantitativa de la microflora sulfatorreductora y metanogénica en relación con los parámetros físico-químicos de sedimentos estuarino-lagunares*. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 157.
- Train, R. E. 1979. *Quality criteria for water*. Castle House Publications. Great Britain. 256.
- Trimmer, M., K. J. Purdy & D. B. Nedwell. 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, U. K. *FEMS Microbiology Ecology*. 24: 333-342.

- Tyler, S. C. 1991. The global methane budget. J. E. Rogers & W. B. Whitman. *Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides and halomethanes*. American Society for Microbiology. New York. 7-38.
- Ueki, A., H. Minato, R. Azuma & T. Suto. 1980. Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digester fluids: enumeration of sulfate-reducers by the anaerobic roll tube method. *Journal of General and Applied Microbiology*. 26: 25-35.
- Valentine, D. L. 1991. Thermodynamic ecology of hydrogen-based syntrophy. S. J. *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 147-161.
- Vance, I. D. & E. Brink. 1994. Propionate-driven sulphate reduction by oil-field bacteria in a pressurised porous rock bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 920-925
- Visser, A., I. Beeksmann, F. Van Der Zee, A. J. M. Stams & G. Lettinga. 1993. Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40: 549-556.
- Vogels, G. D. 1979. The global cycle of methane. *Antonie van Leeuwenhoek*. 45: 347-352.
- Von Wolzogen, K., C. A. H. & I. S. Van Der Vlugt. 1934. The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soils. *Water*. 18: 147-165.
- Wang, X. C., E. R. M. Druffel, S. Griffin, C. Lee & M. Kashgarian. 1998. Radiocarbon studies of organic compound classes in plankton and sediment of the northeastern Pacific Ocean. *Geochemical et Cosmochimical Acta*. 62: 1365-1378.
- Wang, Z. & W. H. Patrick, Jr. 1999. Anaerobic microbially mediated processes. M. E. Summer. *Handbook of Soil Science*. United States of America. C120-C128.
- Ward, D. M. & G. J. Olson. 1980. Terminal processes in the anaerobic degradation of an algal-bacterial mat in a high-sulfate hot in spring. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 67-74.

- Weatherhead, P. J. & R. D. Montgomerie. 1991. Good news and bad news about DNA fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*. 6: 173-174
- Westermann, P. 1993. Wetland and swamp microbiology. T. E. Ford. *Aquatic Microbiology*. Blackwell Scientific Publications. Boston, USA. 215-238.
- Whelan, T. 1974. Methane and carbon dioxide in coastal marsh sediments. I. R. Kaplan. *Natural Gases in Marine Sediments*. Plenum Press. United States of America. 47-61.
- Whitby, C., J. Earl, C. Lanyon, S. Gray, J. Robinson, J. Meadows & C. Edwards. 2004. The molecular diversity of the methanogenic community in a hypereutrophic freshwater lake determined by PCR-RFLP. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 973-984
- Widdel, F. 1988. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. A. J. B. Zehnder. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons. New York. 469-586.
- Widdel, F. & T. A. Hansen. 1992. The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (Ed.). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag. New York, N. Y. I: 583-616
- Winfrey, M. R. & D. M. Ward. 1983. Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 193-199.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. P. Bowlus & G. N. Somero. 1982. Living with water stress: evolution of osmolytic systems. *Science*. 217: 1214-1222.
- Yavitt, J. B. & G. E. Lang. 1990. Methane production in contrasting wetland sites: response to organic chemical components of peat and to sulfate reduction. *Geomicrobiology Journal*. 8: 27-46.
- Zar, J. H. 1999. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall. USA. 254 p.
- Yen, T. F. & J. I. S. Tang. 1977. Chemical aspects of marine sediments. T. F. Yen. *Chemistry of Marine Sediments*. United States of America. 1-38.

Zeep Falz, K., C. Holliger, R. Grobkopf, W. Liesack, A. N. Nozhevnikova, B. Müller, B. Wehrli & D. Hahn. 1999. Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2402-2408.

Zehnder, A. J. B. & T. D. Brock. 1979. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*. 137: 420-432.

Zeikus, J. G. & M. R. Winfrey. 1976. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 31: 99-107.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00059

Matrícula: 202180769

DETERMINACION DE LA DIVERSIDAD Y ACTIVIDAD BACTERIANA SULFATORREDUCTORA Y METANOGENICA EN LOS SEDIMENTOS DE DOS ECOSISTEMAS ESTUARINO-LAGUNARES DEL ESTADO DE CHIAPAS.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 29 del mes de julio del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA
- DRA. NATHALIE CABIROL GUILLES
- DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES
- DR. FREDERIC THALASSO SIRET
- DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLOGICAS  
DE: MARIA DEL ROCIO TORRES ALVARADO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARIA DEL ROCIO TORRES ALVARADO  
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

PRESIDENTA

DRA. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA

VOCAL

DRA. NATHALIE CABIROL GUILLES

VOCAL

DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES

VOCAL

DR. FREDERIC THALASSO SIRET

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO