

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA
EN SEDIMENTOS DE UNA LAGUNA COSTERA DE BOCA EFÍMERA
(LA MANCHA, VERACRUZ).**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOLOGÍA
PRESENTA**

LIC. THALÍA SANDOVAL ALEJALDRE

**Director de Tesis:
DRA. MARÍA DEL ROCÍO TORRES ALVARADO**

**Asesores:
DRA LAURA GEORGINA CALVA BENÍTEZ
DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO**

Ciudad de México

2017

“La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa aprobó la tesis que presentó:

Thalía Sandoval Alejaldre

El día 05 de diciembre del 2017

Comité tutorial:

Directora:

Dra. Rocío Torres Alvarado

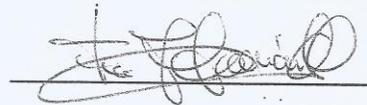


Asesores:

Dra. Laura Georgina Calva Benítez

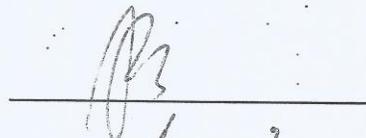


Dr. Francisco José Fernández Perrino



Sinodales:

Dra. Jhoana Díaz Larrea



Dra. Mónica del Pilar Bonilla Salinas



Dedicatoria

A la persona que me hace ser quien soy, sin ella no estaría aquí culminando una de mis metas en la vida, quien ha estado en cada momento bueno y malo, no sólo en esta etapa, si no en mi vida entera. Gracias mami por apoyarme en todo este proceso, definitivamente sin ti no hubiese llegado este día. Has secado mis lágrimas y me viste sufrir, pero gracias a ti aprendí a ser constante y nunca dejarme vencer. Te amo.

A mis hermanos, que me apoyan en todo. Diego, sin tu presencia mi escritura hubiese sido muy aburrida, gracias por alegrar mis días con tus ocurrencias. Christian, gracias por tu apoyo incondicional y tus sabias palabras.

Abis, gracias por tus oraciones por mí, siempre me motivas a crecer cada día.

Hay alguien que sin su apoyo, alegría y amor no hubiera logrado llegar aquí. Ger, gracias con todo mi corazón. La verdad es que creíste en mí incluso cuando yo dejé de hacerlo, soportaste gritos, lágrimas, enojo y frustraciones, pero aun así permaneciste a mi lado dándome ánimos y una sonrisa cada día. Te amo.

A mi papá, que sin saberlo me impulsa a querer ser mejor cada día.

A mi Elvis hermoso, que con su sólo presencia iluminó mis peores momentos, él es quien me vio caer y llorar más veces, pero bastaba su mirada para levantarme, y un beso para calmar la peor tormenta.

Agradecimientos

Gracias a la doctora Rocío Torres por sus comentarios, conocimientos y paciencia en este largo camino. Sé que me tardé más de lo acordado, y que no soy la alumna perfecta, pero siempre tuvo una sonrisa para mí, me escuchó, me dedicó su tiempo y jamás se rindió conmigo aun después de tanto tiempo. Gracias doctora por toda su aportación, más que a la tesis a mi formación completa, porque incluso recuerdo con cariño sus clases en la carrera, servicio social y ahora maestría. No tengo más que decir que GRACIAS.

Doctor Francisco Perrino, no cabe duda que me equivoqué en no buscarlo antes, más allá de todo el apoyo, clases y conocimiento transmitido, siempre tuvo tiempo para mí, me escuchaba y daba ánimos para seguir adelante. No tengo palabras, de verdad gracias.

Doctora Laura Calva, sólo nosotras sabemos la tortura del cromatógrafo, y el hecho de que no aparezcan hidrocarburos es mi tesis. Pero agradezco que siempre me apoyó en todo y estuvo conmigo en este camino.

Miss Paty, gran parte de esto se lo debo. De no haber vuelto a verla probablemente no hubiera reunido las fuerzas necesarias para terminar esto y poder darme cuenta de lo que soy capaz. Gracias.

Mami, incluso cuando creíste que no podrías aportar en esto, me ayudaste con mi abstract. Eres la mejor. Te admiro y te amo. Gracias.

Amigos son los que te apoyan hasta el final, y debo decir que en este largo camino pude conocer maravillosas personas. Ale Serrato, me ayudaste en todo momento dentro y fuera del laboratorio, gracias por escucharme y ser mi amiga. Gracias a todos mis amigos que hice en molecular, creo que todos sabían cuánto deseaba esto. Pero hubo quienes se volaron la barda apoyándome. Lau, te quedaste conmigo hasta las 10 de la noche en lab enseñándome DGGE, no sabes cómo valoro eso, pero valoro aún más tu amistad. Memo, me explicaste tantas veces estadística... gracias totales.

Quisiera mencionar a Jhoa, (sí, la Dra. Jhoana Díaz) más que mi sinodal te considero mi amiga. Fuiste quien se sentó conmigo a escribir, algo que nadie más hizo. Siempre te preocupaste por mí. Gracias.

Prof Sergio Álvarez, a pesar de que soy una completa roca en bioestadística siempre me tuvo paciencia y tuvo tiempo para mí incluso sin ser su alumna. Ya no hay personas así, le agradezco infinitamente.

A todas las personas que me dieron ánimos y creyeron en mí. Gracias!... Y a las que no... también por que me hicieron más fuerte.

También se agradece a

A mi comité tutorial. Es el mejor.

Al profesor Francisco Mendieta, siempre al pendiente de mí y siempre dispuesto a ayudar en todo.

A la doctora Mónica Bonilla, estuvo al pendiente de todos los errores que había cometido y me ayudó a corregir y entender muchas cosas.

Gracias a CONACYT por la beca otorgada por los primeros dos años de mi maestría.

Al Laboratorio Divisional de Biología Molecular. Ahí realicé casi todo el trabajo de mi tesis.

Al laboratorio de Ecosistemas Costeros. Ahí comencé mi formación y le debo mucho de lo que soy ahora.

Gracias a mi amada Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Marco teórico	
1.1 Lagunas costeras.....	3
1.2 Sedimentos y materia orgánica.....	4
1.3 Comunidad bacteriana.....	5
Algunas técnicas moleculares	
PCR.....	7
DGGE.....	7
ARN ribosomal.....	8
Antecedentes.....	10
Pregunta de investigación.....	14
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos Particulares.....	14
Área de estudio.....	15
Aspectos metodológicos	
1.- Trabajo de campo.....	18
2.- Trabajo de laboratorio	
a) Análisis sedimentario.....	18

b)Análisis estadístico.....	19
c) Determinación de la composición bacteriana.....	20
Extracción de ácidos nucleicos.....	20
Amplificación por PCR del gen 16S ARNr.....	20
Análisis de DGGE.....	22
Divergencia nucleotídica.....	22
Análisis filogenético.....	23
Análisis máxima parsimonia.....	23
Análisis de máxima verosimilitud y bayesiano.....	23
Resultados y discusión	
Caracterización fisicoquímica.....	25
Variables ambientales del agua.....	25
Variables ambientales del sedimento.....	32
Resultados estadísticos	
Correlación.....	40
Caracterización microbiana.....	42
Análisis moleculares.....	42
a) Extracción.....	42
b) PCR anidada.....	44
c) DGGE y Blast.....	46

Taxonomía y clasificación.....	51
Filogenia.....	67
Características del gen.....	67
Divergencia en las secuencias del gen 16S.....	67
Análisis filogenéticos.....	67
Importancia ecológica.....	70
Conclusiones.....	75
Perspectivas futuras.....	79
Bibliografía.....	80
Anexos.....	99

Resumen

Las lagunas costeras se caracterizan por ser la mezcla de agua dulce y salada, provocando que estos sistemas sean sumamente dinámicos, esto genera un comportamiento ecológico muy particular. Las bacterias presentes en los sedimentos de dichos ecosistemas tienen un papel crítico en el funcionamiento de los ecosistemas, tal como reciclaje de materia orgánica, cadenas alimentarias y los ciclos biogeoquímicos; sin embargo, existen pocos estudios en donde se evalúa la composición microbiana en este tipo de sistemas. En el presente trabajo se investigó la composición microbiana en la laguna de La Mancha, Veracruz, así como su relación con las variables fisicoquímicas. Las muestras de sedimento se colectaron en los meses de julio y noviembre del 2013, y en junio del 2014. Se realizó una PCR anidada con primers específicos del dominio bacteria para posteriormente realizar un DGGE a partir de fragmentos del 16S ARNr con lo que se secuenciaron las bandas del gel para construir un árbol filogenético de las especies obtenidas. El análisis granulométrico mostró que el componente principal en el sistema lagunar son las arenas finas. Al realizar el análisis de correlación de Pearson se concluyó que existen diferencias significativas entre ciertas variables. Atendiendo a categorías taxonómicas inferiores, en el sedimento se obtuvieron 12 especies pertenecientes a nueve géneros: *Sacharophagus degradans*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *Ectohiorhodospira mobilis*, *Rhodanobacter denitrificans*, *Geobacter bemidjiensis*, *Geobacter daltonii*, *Geobacter uraniireduces*, *Geobacter metalliredicens*, *Desulfuromonasacetoxidans*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophus aciditrophicus* y *Planococcus halocryophilus*. La topología del árbol filogenético confirmó que todas las muestras obtenidas en el presente estudio se ubican en un clado monofilético, hermano al clado que incluye la secuencia de *Saccharophagus degradans*. De acuerdo a lo obtenido se infiere que existe sintrofia entre las especies encontradas del tipo fermentativo, sulfatoreductoras y metanogénicas.

Palabras clave: laguna costera, sedimento, La Mancha, composición microbiana, PCR anidada, DGGE, árbol filogenético, sintrofia.

Abstract

The coastal lagoons are characterized by the mixture of fresh and salty water, causing these systems to be extremely dynamic, thus generating a very particular ecological behavior. The bacteria present in the sediments of this ecosystems have a critical role in its functioning, such as the recycling of organic matter, food chains and biogeochemical cycles; however, there are few studies where microbiology is evaluated in this type of ecosystems. In the present work, microbiology was investigated in the La Mancha lagoon, Veracruz, as well as its relationship with physicochemical variables. The sediment samples were collected in the months of July and November in 2013, and in June 2014. Nested PCR was carried out and specific markers of the domino bacteria were used to implement DGGE from 16S rRNA, the bands of the gel were used to build a phylogenetic tree. The granulometric analysis showed that the main component in the lagoon system were fine sands. . When performing the Pearson correlation analysis, it was concluded that there were significant differences between certain variables. Attending to lower taxonomic categories, in the sediment 12 species belonging to nine genera were obtained: *Sacharophagus degradans*, *Thioalkalivibrio sulfidophilus*, *Ectohiorhodospira mobilis*, *Rhodanobacter denitrificans*, *Geobacter bemidjiensis*, *Geobacter daltonii*, *Geobacter uraniireduces*, *Geobacter metalliredicens*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophus aciditrophicus* and *Planococcus halocryophilus*. The topology of the phylogenetic tree confirmed that all the samples presented in the present study are located in a monophyletic clade, brother to the clade that includes the sequence of *Saccharophagus degradans*. According to the obtained results there is a syntrophy between the fermentative, sulfate-reduction and methanogenic species found.

Key words: coastal lagoon, sediment, microbial, nested PCR, DGGE, phylogenetic tree, syntrophy.

MARCO TEÓRICO

Lagunas costeras

Las zonas costeras se caracterizan por la presencia de diversos ecosistemas, como estuarios y lagunas costeras, que se forman por la mezcla del agua dulce de origen continental con el agua marina que ingresa al sistema a través de las mareas.

Las lagunas costeras se definen como cuerpos de agua someros (generalmente de 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. La conexión marina se mantiene a través de la boca o canales mareales (de Wit *et al.*, 2001). La mayoría de las lagunas están relacionadas con una cuenca continental dulceacuícola a través de los aportes fluviales, algunos permanentes (como en las lagunas de Alvarado y Tamiahua) o efímeros (como en la laguna de La Mancha, Veracruz, México).

La mezcla de agua en estos ecosistemas genera gradientes espaciales de salinidad. De manera general, los gradientes de salinidad actúan como un factor de estrés, influyendo (directa o indirectamente) en el establecimiento de diferentes taxa y en la composición y distribución de especies. El gradiente de salinidad también se vincula con otros gradientes químicos, como la distribución de nutrientes y materia orgánica, cuya concentración generalmente es mayor en la desembocadura del río, disminuyendo hacia la comunicación con el mar.

Lo anteriormente mencionado determina un comportamiento ecológico muy particular, como la presencia de ciclos biogeoquímicos intrincados, una alta diversidad de hábitats y una compleja cadena alimentaria (UNESCO, 1981). Asimismo, las lagunas costeras son lugares que funcionan como zonas de protección, reproducción y alimentación para diferentes organismos marinos, como peces y crustáceos (por esa razón, las pesquerías litorales dependen de la presencia de lagunas costeras y manglares).

Sedimentos y materia orgánica

Los sedimentos son un factor importante en el control de las lagunas costeras. Generalmente presentan concentraciones considerables de materia orgánica (MO) y nutrientes (Kennish *et al.*, 1986). La MO proviene de diversas fuentes, que se agrupan en tres categorías: alóctonas, antropogénicas y autóctonas. En los océanos la mayor parte del ciclo de la MO se origina en la columna de agua, pero en las lagunas costeras, al tener aguas someras, gran parte de la MO se precipita en el fondo, y por ello los sedimentos se consideran trampas de carbono. El contenido orgánico está estrechamente relacionado con la textura de los sedimentos, siendo las arcillas y limos los que retienen mayor cantidad de residuos orgánicos. Esta MO es incorporada al bentos, donde es degradada y modificada por densas comunidades microbianas.

El sedimento es el hábitat de los organismos bentónicos (moluscos, crustáceos, peces) y conforma el substrato para los diversos microorganismos. La MO es incorporada al bentos, donde es degradada y modificada por densas comunidades microbianas.

La microbiota bentónica está compuesta por miembros de los dominios Bacteria, Archaea, Eukarya y el grupo de los virus. Particularmente, las bacterias y arqueas desempeñan un papel fundamental en la mineralización de la MO, ya que son responsables de la oxidación del carbono orgánico, tanto por procesos aerobios como anaerobios (Hansen *et al.*, 2000). Participan también en los ciclos del nitrógeno, fósforo y azufre, contribuyendo al reciclamiento de los nutrientes. Asimismo, generan biomasa celular bacteriana que representa un potencial de energía para diversos organismos detritófagos dentro del estuario (Moran & Hodson, 2000).

En los sedimentos, los ciclos de varios elementos químicos no sólo son afectados por la actividad de la microbiota bentónica, sino también por reacciones geoquímicas llevadas a cabo en la interfase agua-sedimento, como el intercambio y la difusión de iones disueltos o adsorbidos y por la presencia de diversos compuestos y gases (Kennish, 1986).

Comunidad bacteriana

Las bacterias son uno de los grupos de organismos más abundantes y de mayor riqueza. Dykhuizen (1998) ha especulado que podría haber 10^{12} especies bacterianas en la tierra. Estos microorganismos participan en diferentes procesos en el ecosistema. Juegan un papel crítico en el funcionamiento de los ecosistemas marinos, tal como en el proceso de la desintoxicación del medio ambiente, el reciclaje de materia orgánica, redes alimentarias bentónicas, y los ciclos biogeoquímicos (Cabello *et al.*, 2004; Barbier *et al.*, 2011). El crecimiento y sobrevivencia de estos microorganismos están determinados principalmente por la disponibilidad de componentes, orgánicos e inorgánicos, que son usados como fuentes de energía y por la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones fisicoquímicas, como la temperatura, pH o presión.

Las bacterias presentes en los sedimentos marinos y costeros presentan heterogeneidad espacial, en términos de abundancia, diversidad y actividad, en dimensiones tanto horizontal como vertical (Urakawa *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008a,b). Se ha demostrado que la composición bacteriana de las comunidades varía de acuerdo a la temperatura, nutrientes, salinidad, contaminación, depredación, y muchas otras variables (Horner-Devine *et al.*, 2004). Dichas variables se pueden presentar en gradientes en los sistemas acuáticos: por ejemplo, en la interfase de la capa óxica y anóxica de lagos estratificados o en la superficie de los sedimentos (Coyne *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2000).

Los gradientes de temperatura, nutrientes y salinidad son áreas de composición particularmente dinámica, así como de cambios funcionales en sistemas marinos (Bouvier & Giorgio, 2002). En particular, a lo largo de gradientes de salinidad ocurren cambios ecológicos importantes, como la disminución de la biodiversidad y el incremento de la dominancia de los microorganismos (Rodríguez-Valera 1988,1993). Los gradientes de salinidad se encuentran en una amplia gama de ambientes marinos, especialmente en estuarios y humedales asociados, pantanos y lagunas costeras (Kaiser *et al.*,2005). La gestión a largo plazo de estos ecosistemas, que se ha visto a menudo muy amenazada por cambios antropogénicos y climáticos (Dauvin

et al., 2006), se basa en una mejor comprensión del efecto de la salinidad sobre la estructura y el funcionamiento de los microorganismos. Sin embargo, las comunidades bacterianas de estos ecosistemas no han sido muy estudiadas. El análisis de variables ambientales, como la temperatura, pH o la geografía, correlacionado con las diferencias entre las diversas comunidades microbianas podría revelar con facilidad que los microorganismos toleran diferentes tipos de cambios ambientales y aumentaría nuestra comprensión de la ecología microbiana y la evolución (Lozupone & Knight, 2007).

Pero algunas bacterias son difíciles de cultivar por métodos tradicionales, por lo que en la actualidad la fuente principal de información acerca de su diversidad y distribución ambiental se encuentra en la secuencia de los genes (Lozupone & Knight, 2007). Las llamadas “huellas moleculares” generan perfiles específicos de las comunidades microbianas basado en el análisis directo de los productos de PCR amplificados a partir del ADN de muestras ambientales (Muyzer, 1999). La diversidad bacteriana revelada por medio del análisis de filogenético molecular puede ser un mejor reflejo de la diversidad metabólica bacteriana real. Conocer esta diversidad es fundamental para comprender la adaptación microbiana a diferentes entornos y su función en esos ambientes. La secuenciación de los genes para el ARNr 16S de muestras ambientales ha revolucionado nuestra comprensión de la sistemática y diversidad microbiana, revelando cuán lejos estamos de catalogar la gran diversidad de microorganismos en la Tierra (Pace, 1997; Hugenholtz *et al.*, 1998; Rappe *et al.*, 2003; Schloss & Handelsman, 2004). Los estudios de filogenia molecular basados en este tipo de moléculas también han aportado mucha información en cuanto a comunidades bacterianas en sedimento, pero sólomente a nivel de clases (Hernández-Raquet *et al.*, 2006, Todorova *et al.*, 2014).

Algunas de las técnicas utilizadas principalmente para este propósito son: DGGE/TGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) (electroforesis en gel con gradiente de temperatura), ARDRA (análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado) y T-RFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción terminales).

Las huellas moleculares permiten un enfoque que se ha utilizado para demostrar las diferencias entre las comunidades microbianas (Rastogi & Sani, 2011). La mayoría de los estudios realizados en filogenia microbiana se mantienen en la categoría de género (Baker *et al.*, 2015; Gontang *et al.*, 2007), y suelen evaluar la riqueza y la composición bacteriana.

Algunas técnicas moleculares

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. Esta se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología y evolución entre otras (Cornejo *et al.*, 2014).

Siempre es mejor la utilización de secuencias de primers ya publicados para el dominio con el que se va a trabajar, esto debido a que ya han sido probados por otros investigadores. Además de que el diseño de ellos será la variable más importante en la PCR, ya que el éxito o fracaso de la PCR dependerá de que tan buenos fueron los primers empleados (Najafov, 2016).

DGGE

La DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (una

mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. La concentración desnaturante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos.

Los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina son más estables y solo se desnaturizan en cadenas sencillas una vez que alcanzan altas temperaturas o concentraciones de un agente químico desnaturante. Ya que en un gel con gradiente desnaturante la resolución óptima se consigue cuando las moléculas de ADN no se desnaturizan por completo, la amplificación por PCR de los fragmentos a analizar por DGGE requiere del uso de iniciadores modificados con la llamada “grapa GC”, que evita que las cadenas de ADN se separen por completo.

Finalmente, es posible identificar a cada uno de microorganismos que integran una comunidad microbiana en el que idealmente, cada banda representa a un miembro de la comunidad. Las secuencias pueden analizarse y ensamblarse en el software BioEdit. Posteriormente deberá llevarse a cabo el análisis de similitud de las secuencias. Es decir, utilizando determinadas herramientas bioinformáticas (Cornejo *et al.*, 2014).

ARNribosomal

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados, que participan en el proceso de síntesis de proteínas. Los ribosomas procarióticos funcionales son partículas con un coeficiente de sedimentación 70S y una masa de aproximadamente 2.4×10^6 Da. Están formados por dos subunidades: una subunidad 30S y otra subunidad 50S, cada una de las cuales es un complejo de ARN ribosomales específicos (abreviados como ARNr) y proteínas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas como S1-S21), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (L1-L34) (Mathews *et al.*, 2002).

En bacterias, los genes que codifican los ARN ribosomales están organizados en operones (conjunto de genes que se transcriben a partir de la misma región promotora). Cada operón ribosómico incluye genes para los ARNr 23S, 16S y 5S, separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG), y contiene además genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt) (Rodicio & Mendoza, 2004) (Fig. 1).

El gen 16S ARNr es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 pb, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por lo tanto, una diana universal para su identificación. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariontes y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1,500 pb) minimiza las fluctuaciones estadísticas. Además, la conservación en la estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento (Woese, 1987).

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (del Rosario Rodicio & Mendoza, 2004).

El ARNr 16S es una de las moléculas más ampliamente utilizadas en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas, su análisis se ha realizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, clasificación e identificación bacteriana (Woese *et al.*, 1990).

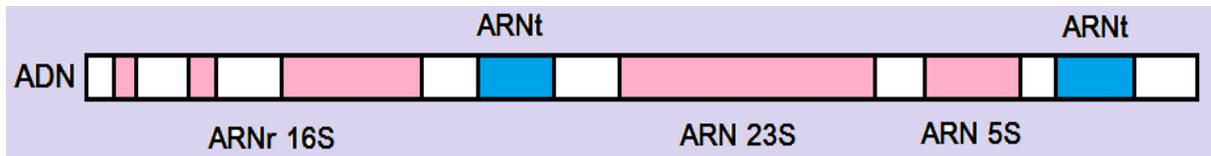


Fig. 1. Organización del ADN ribosomal en una célula procariótica.

Antecedentes

La diversidad microbiana se ha convertido en un tema relevante debido a la importancia que tienen los microorganismos en las transformaciones de la energía y la materia. El conocimiento sobre la estructura de la comunidad bacteriana y la diversidad es esencial para comprender su relación con los factores ambientales y las funciones de los ecosistemas. Tal conocimiento se puede utilizar para evaluar el efecto sobre los ecosistemas de estrés ambiental y perturbaciones como la contaminación, la explotación agrícola y los cambios globales. Asimismo, nos da cuenta de que el potencial funcional y genético de los microorganismos puede ser superior al de los organismos superiores, por lo que podría constituir una valiosa fuente de nuevos productos y tecnología. A pesar de su importancia, en la actualidad no sabemos aún la magnitud de la diversidad bacteriana en la mayoría de los ecosistemas (Torsvik *et al.*, 1996). por la dificultad de estudiarlas con las técnicas tradicionales basadas en el empleo de métodos de cultivo.

Estudios en diferentes ambientes estiman que más del 99% de los organismos vistos con el microscopio no pueden ser cultivados (Hugenholtz & Pace, 1996), porque la mayoría de las bacterias en el sedimento no crecen en condiciones de laboratorio, a pesar de que son metabólicamente activas. Un problema adicional es que estas bacterias a menudo dan un alto porcentaje negativo en la aplicación de kits de diagnóstico catabólicos y bioquímicos, debido a la expresión baja de genes en las condiciones utilizadas. Esto implica que sólo una pequeña parte de la información genética de una población o una comunidad se explora en la aplicación de los métodos tradicionales para las mediciones de diversidad, por lo que las técnicas

moleculares han sido de gran importancia para potenciar estos análisis (Fægri *et al.*, 1977).

La secuenciación de los genes 16S ARNr de muestras ambientales ha revolucionado la comprensión de la diversidad microbiana y sistemática, que revela cuán lejos se está de la catalogación de la gran diversidad de microorganismos en la Tierra. La determinación de los factores físicos y químicos, tales como la temperatura, el pH, o la geografía, que se correlacionan con las diferencias entre las diversas comunidades microbianas revelarán la facilidad con que los microorganismos toleran diferentes tipos de cambios ambientales y aumentarán la comprensión de la ecología microbiana y la evolución (Hugenholtz *et al.*, 1998; Pace, 1997). Muchos de los estudios de ecosistemas microbianos naturales basados en ácidos nucleicos han puesto al descubierto nuevos tipos de secuencias de ARNr, que a menudo representan linajes sólo lejanamente relacionados con los conocidos. (Pace, 1997).

Existen estudios realizados con métodos basados en el ADN de las comunidades microbianas en áreas costeras tales como lagunas costeras, estuarios, marismas y manglares (Bouvier & del Giorgio, 2002; Córdova-Kreylos *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008, 2010, 2011; Said *et al.*, 2010). Dichos estudios proporcionan información fundamental acerca de las interacciones microbianas en estos ecosistemas, y el efecto que tiene el continuo crecimiento de las zonas urbanas en estos ambientes (Gomes *et al.*, 2013).

Zhou *et al.* (2002) observaron que los suelos saturados con carbono tenían menos taxa, y una distribución desigual de taxa bacterianos mayor que en suelos no saturados. En cuanto a heterogeneidad, Webster *et al.* (2002) mencionaron que las comunidades bacterianas del suelo muestran una heterogeneidad espacial significativa en escala de cerca de 1m, la escala espacial en la cual las concentraciones de pH y amonio variaron. Sin embargo, otros estudios han observado homogeneidad en la composición de la comunidad en esta escala espacial (p. ej. Felske & Akkermans 1998; Piceno *et al.*, 1999).

En el caso de las comunidades microbianas (bacterias, arqueas y virus), los estudios realizados hasta el momento en zonas costeras demuestran que éstas presentan

una heterogeneidad espacial en términos de abundancia, diversidad y actividad asociada con los cambios de salinidad y la cantidad y calidad de la materia orgánica, ya que ésta conforma el sustrato para los diversos microorganismos (Urakawa *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008a,b).

En algunos estuarios templados se ha demostrado que existen cambios drásticos en la composición microbiana en áreas discretas a lo largo del gradiente de salinidad, dominando las α -Proteobacterias en la zona marina y las β -Proteobacteria en la porción dulceacuícola, mientras que *Cytophaga-Flavobacterium* se localiza en la porción media del estuario (Bouvier & del Giorgio, 2002). Por el contrario, en otros trabajos se ha establecido que los cambios de la composición microbiana son graduales, como sucede en los sedimentos estuarinos (generalmente reductores y anóxicos), donde a pesar de que existe una separación espacial de los procesos anaerobios terminales, con las bacterias sulfatorreductoras dominando en la zona marina y las arqueas metanogénicas en la porción dulceacuícola, ambas comunidades microbianas pueden coexistir a lo largo del gradiente salino (Takii & Fukui, 1991; Purdy *et al.*, 2001).

Aunado a lo anterior, algunas investigaciones han demostrado cambios ecológicos importantes, como una disminución de la biodiversidad y el incremento de la dominancia de determinados microorganismos (Rodríguez-Valera 1988 y 1993). Benlloch *et al.* (2002) determinaron, a partir de análisis filogenéticos, que al aumentar la salinidad, el número de grupos bacterianos disminuye y solamente uno se vuelve dominante.

Se ha observado también que, independientemente del gradiente de salinidad, en las zonas costeras hay una presencia constante de algunos grupos bacterianos, como es el caso de los Actinobacteriales y la clase γ -Proteobacteria (que incluye las bacterias púrpuras del azufre). Esto puede ser explicado con base en la tolerancia de dichos grupos microbianos a las condiciones fluctuantes de la salinidad (Methé *et al.*, 1998).

En México existen pocos estudios sobre la dinámica de las comunidades microbianas. Torres-Alvarado *et al.* (2013) investigaron, por medio de técnicas tradicionales, la dinámica temporal y espacial de la actividad 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.

León-Galván *et al.* (2009) evaluaron la comunidad microbiana del sistema de lagunas Nichupte-Bojorquez, ubicada en Cancún, México. El análisis se realizó utilizando un enfoque molecular independiente de cultivo, usando muestras de agua de superficie. Encontraron un perfil bacteriano dominado por el grupo Bacteroidetes en particular. El segundo grupo más abundante fue asignado al grupo Proteobacteria y una proporción menor de bacterias que pertenece a las clases Cyanobacteria y Bacilli.

Mediante métodos moleculares basados en ácidos nucleicos, combinado con estimaciones de biomasa (ATP), pigmentos y mediciones de microelectrodos de gradientes químicos, en una esterilla microbiana hipersalina de Guerrero Negro, Baja California Sur, México, Ley *et al.* (2006) encontraron una diversidad inesperada. La mayoría de las secuencias de ARNr 16S bacterianas generadas fueron únicas, y las bacterias del filo Chloroflexi formaron la mayor parte de la biomasa en porcentaje de rRNA. Este resultado contradice la creencia general de que las cianobacterias dominan estas comunidades. La complejidad biológica del estero excede con mucho a la observada en otros ecosistemas microbianos ricos en polisacáridos, y sugiere que existen reacciones positivas entre la complejidad química y la diversidad biológica.

Existen algunos estudios específicos sobre microorganismos en la laguna de La Mancha, como el de Torres-Alvarado *et al.*, (2016). En este trabajo, los análisis microbiológicos incluyen la cuantificación de las bacterias sulfatorreductoras (BSR) y arqueas metanogénicas (AM) viables con diferentes sustratos. Sin embargo, no se muestra la composición bacteriana a lo largo del cuerpo acuático. El presente trabajo complementaría esa parte faltante, de ahí su importancia.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la composición bacteriana en los sedimentos de una laguna costera? ¿Ésta cambia con base en las diferentes concentraciones de salinidad y materia orgánica?

HIPÓTESIS

Si los sedimentos presentan un gradiente de salinidad y de materia orgánica, es de esperarse que la diversidad bacteriana en estos sedimentos presente cambios como resultado de dicho gradiente.

OBJETIVO GENERAL

Analizar, a lo largo de un gradiente de salinidad y materia orgánica, en diferentes meses, la diversidad bacteriana en los sedimentos de la laguna costera de La Mancha, Veracruz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la composición bacteriana en los sedimentos lagunares
- Determinar las características fisicoquímicas y granulométricas del hábitat sedimentario.
- Establecer una posible relación entre la composición bacteriana y el gradiente químico de salinidad y materia orgánica
- Establecer la importancia ecológica de la composición microbiana para el ecosistema costero de La Mancha, Veracruz.

ÁREA DE ESTUDIO

La costa veracruzana tiene una extensión de 745.14 km; en ella existen numerosas lagunas costeras, entre las que sobresalen de norte a sur: Pueblo Viejo, Tamiahua, Tampamachoco, El Llano, La Mancha, Mandinga, Alvarado, Sontecomapan y El Ostión; asimismo se localizan los estuarios de los ríos Tuxpan, Papaloapan, Coatzacoalcos y Tonalá (Contreras-Espinosa, 2005).

La laguna de La Mancha (Fig. 2) se encuentra entre los 19°34' y 19°42' de latitud norte y los 96°27' y 96°32' de longitud oeste, en el municipio de Actopan y tiene una extensión de 132 ha (Contreras-Espinosa, 2005).

La laguna de La Mancha es una típica laguna costera de trampa de post-barra y post-acantilado, salobre y poco profunda (<3m) y se encuentra en un proceso natural de colmatación. La laguna se clasifica como de tipo III de acuerdo a la clasificación de Lankford (Lankford, 1977). La salinidad es altamente variable, desde condiciones oligohalinas (0-5) hasta hipersalinas (>40). La zona constituye una llanura acumulativa formada por sedimentos lacustres, fluviales y biógenos, en ocasiones inter-estratificados con depósitos marinos (Castañeda & Contreras, 2001).

Tiene una precipitación media de 1,767 mm/año y una velocidad de evaporación de 1,500 mm. Tres periodos meteorológicos han sido reconocidos en la región: temporada de secas, de febrero a mayo, que se caracteriza por vientos del este y sud-este con una baja precipitación (44 ± 37 mm/año); temporada de lluvias, de junio a septiembre, con los patrones de viento similares, pero con alta precipitación (224 ± 25 mm) (Varona-Cordero, 2011); y el periodo de "Nortes", de octubre a febrero, caracterizado por los vientos fríos del norte (80-100 km/h) y fuertes tormentas ocasionales (Sanvicente-Añorve *et al.*, 2000). El clima es del tipo Aw2 y se caracteriza por ser cálido subhúmedo, con régimen de lluvias de verano (Travieso-Bello, 2000).

La laguna presenta una comunicación temporal con el mar, con una barrera arenosa que cierra durante los nortes. Por consiguiente, es un sistema de características intermitentes, por el efecto de la apertura y cierre de la boca, que a su vez está

regulada por el balance de la marea (tipo mixta con predominancia diurna, con una amplitud que varía de 30-80 cm y una media anual de 50 cm) (CICESE, 2009). Recibe descarga de agua dulce de la cuenca del río Caño Grande, donde el uso de la tierra es principalmente de cultivos de maíz y pastoreo para la ganadería (Travieso-Bello, 2000).

La conexión hidrológica de la laguna costera generalmente se interrumpe entre septiembre y octubre, cuando la barra de arena se cierra en el comienzo de la temporada de Nortes. La comunicación hacia el mar se abre de nuevo en marzo o abril, ya sea porque la cuenca del lago se llena debido a la afluencia constante del Río Caño Grande (Villalobos-Figueroa *et al.*, 1984), lo que erosiona la barra de arena, o porque se abre manualmente por la población local (Utrera-López & Moreno-Casasola, 2008). La dinámica de apertura-cierre regula los ciclos y procesos hidrológicos, biológicos y ecológicos en la laguna (Domínguez *et al.*, 2006).

La vegetación natural cubre sólo el 22% de la superficie total de la cuenca (5.264 ha) y comprende árboles de hoja perenne, bosques tropicales, humedales y dunas; mientras que la agricultura y pastizales ocupan el 42% de la superficie total (Travieso-Bello, 2000).

La vegetación circundante se compone de bosque de mangles, selva tropical, herbazal de ciénaga tropical, vegetación secundaria, frutales, cultivos de caña y pastos para la actividad ganadera. Las especies de manglar son *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa* y *Conocarpus erectus*, que se encuentran bajo la categoría de amenazadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059 SEMARNAT-2010. Además, el área es un corredor biológico para especies de aves (Hernández-Trejo *et al.*, 2006).



Figura 2. Estaciones de muestreo. Laguna de La Mancha, Veracruz.

ASPECTOS METODOLOGICOS

1. Trabajo de campo.

Se efectuaron tres muestreos en la Laguna de la Mancha, en el estado de Veracruz, entres meses: julio y noviembre de 2013 y junio del 2014.

Las variables fisicoquímicas del agua de la laguna (temperatura, pH y oxígeno disuelto) se evaluaron mediante una sonda multiparamétrica YSI Incorporated (modelo 536). La profundidad y transparencia fueron evaluadas mediante el disco de Secchi.

Las muestras de sedimento fueron recolectadas en ocho diferentes puntos de la laguna utilizando una draga Ekman. Las muestras destinadas para la evaluación de la composición bacteriana se almacenaron en bolsas de plástico Ziploc. Las muestras paralas características sedimentarias se almacenaron en frascos de vidrio previamente lavados y enjuagados conacetona.

Las muestras fueron transportadas a baja temperatura (4°C) para su procesamiento en el laboratorio.

2. Trabajo de laboratorio.

a) Análisis sedimentario

Para la cuantificación de las muestras de sedimento, éstas se centrifugaron a 3,600 rpm a baja temperatura (4-5°C) durante 20 minutos, para separar el agua intersticial del sedimento (Howes *et al.*, 1985). El agua intersticial se filtró a través de membranas Millipore® de 0.45 µm. de diámetro de poro. En el agua intersticial se determinó la salinidad por medio de un refractómetro óptico (American Optical) y los carbohidratos disueltos totales (Anexo 1) con la técnica de fenol-ácido sulfúrico (Dubois, 1956).

En el sedimento húmedo se llevó a cabo la evaluación del contenido de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) siguiendo las recomendaciones de APHA (2005) (Anexo 2).

Para determinar el porcentaje de carbono orgánico (CO), los sedimentos fueron secados a temperatura ambiente y se tamizaron en una malla de 0.25mm. El porcentaje de CO se determinó mediante la técnica propuesta por Gaudette *et al.* (1974), que consiste en la titulación del exceso de dicromato de potasio con sulfato ferroso (Anexo 3). Dicha técnica tiene una precisión de $\pm 0.25\%$.

Para la caracterización del tamaño de grano se realizó un análisis granulométrico. Se hizo la separación de la fracción arena limo-arcilla vía húmeda y esta fracción se analizó por medio de la técnica de pipeteo propuesta por Folk (1974). En cuanto a las arenas, se cuantificaron como fracción total (Anexo 4).

b) Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Omnibus para verificar si los datos se comportaban de manera normal, y una prueba de homoscedasticidad para analizar qué tanta variabilidad había entre grupos. A partir de estos datos se realizó un ANOVA en caso de que se cumpliera con los estándares. De no ser así, se realizó la prueba no paramétrica correspondiente (en este caso una prueba de Kruskal-Wallis, para determinar si había diferencias significativas entre estaciones).

No se realizó un análisis para verificar diferencias entre meses, debido a que se necesitaban más datos puntuales en cada estación de cada mes. Sin embargo, se realizaron diagramas de caja para visualizar las diferencias entre medias de los parámetros registrados.

Para el análisis de correlación se realizó una transformación logarítmica de los datos, con lo que se justifica la normalidad de los mismos. Finalmente se realizó una prueba de correlación de Pearson para verificar si las variables se relacionaban entre sí significativamente.

Para los análisis se utilizó el programa estadístico Statistical System (NCSS, versión 1997)

C) Determinación de la composición bacteriana.

Se obtuvieron secuencias microbianas del gen 16S de la base de datos del GenBank para el análisis molecular (Anexo 5).

La identidad de las secuencias de nucleótidos obtenidas en el presente estudio fue verificada con un análisis BLAST estándar nucleótido-nucleótido (Altschul *et al.*, 1990), realizada en la página de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Extracción de los ácidos nucleicos.

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó con el kit PowerSoilDNA (MoBio, Solana Beach, Calif.) con 1 g del sedimento húmedo y siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 6). El resultado de la extracción de los ácidos nucleicos se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, visualizándose en un Fotodocumentador Gel Logic 2200 PRO. El producto obtenido se cuantificó mediante un Nanodrop 2000.

Amplificación por PCR del gen 16S ARNr

Se realizó una PCR anidada, la cual es más específica y sensible para la amplificación de fragmentos del gen 16S ARNr. Esta técnica comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una. El producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

El ADN extraído fue usado para la amplificación mediante la primera PCR en un termociclador Bio-Rad, con primers específicos para el dominio Bacteria (F8 y R1392, esperando un producto de alrededor de 1384 pb).

La mezcla de reacción a 25 µl para la PCR consistió en: 1 µl de ADN (Tabla 5), 2.5 µl de buffer (10x) (Promega), 0.5 µl dNTPs (10 mM), 2.0 µl de MgCl₂25 (mM), 2.0 µl de primers (10x), 0.25 µl de Taq Polimerasa (500 U) y 15.75 de agua libre de nucleasas. Los primers utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 1. Las

condiciones del termociclador fueron las siguientes: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 53.8°C y 1 min a 72°C, la PCR terminó con una extensión final a 72°C durante 1 min. Los amplicones obtenidos de la primera PCR fueron purificados mediante el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega®).

Tabla 1. Primers utilizados en la amplificación.

PCR	Secuencia	Secuencia de los primers
1	F-8	5'-AGT GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'
	R-1392	5'-ACG GGC GGT GTG TAC -3'
2	F-1070	5'-ATG GCT GTC GTC AGC T -3'
	R-1392+GC	5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CAC GGG CGG TGT GTA C -3'

Posteriormente se realizó la segunda PCR, con los primers específicos para bacteria F1070 y R1392-GC (producto esperado de alrededor de 322 pb). Las condiciones del termociclador para la PCR anidada fueron: desnaturalización inicial a 95°C 2 min, 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 65.2°C ,1 min a 72°C y 72°C durante 5 min.

Los amplicones obtenidos de la segunda PCR fueron purificados nuevamente con el mismo kit para proceder a la DGGE (Anexo7).

Cabe mencionar que en algunas muestras no se obtuvo el tamaño de banda esperado, por lo cual se utilizó un coadyuvante en la mezcla de reacción: 2 µl de ADN (Tabla 5), 2.5 µl de buffer (10x) (Promega), 1.0 µl dNTPs (10 mM), 2.0 µl de MgCl₂ (25 Mm), 3% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO) (0.7µl), 1.0 µl de primers (10x) y 0.2µl de Taq Polimerasa (500 U). Se completaron los 25 µl con agua libre de nucleasas.

Análisis de DGGE

El DGGE (gel de electroforesis en gradiente desnaturizante) (Anexo 8) se efectuó en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 6%, con un gradiente de urea-formamida (30-60). El gel se sometió a electroforesis con buffer TAE 1X durante 16 horas a 100V. Después de la electroforesis se aplicó la tinción de plata para la visualización de bandas.

Las bandas claramente distinguibles fueron cortadas mediante un bisturí estéril, se colocaron microtubos estériles de 1.5 µl. Se adicionaron 50 µl de agua Millipore a cada tubo y se mantuvieron a 37°C durante 3 hrs, y posteriormente a 4° durante 24 hrs. A continuación las bandas fueron purificadas mediante el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

A continuación, se realizó una PCR en 50 µl para recuperar el ADN, la mezcla de reacción consistió en: 10 µl de ADN, 5.0 µl de buffer (10x) (Promega), 1.0 µl dNTPs (10 mM), 4.0 µl de MgCl₂ (25mM), 4.0 µl de primers F1070 y R1392 (10x) y 0.5 µl de Taq Polimerasa (500 U). Finalmente, los amplicones obtenidos fueron purificados (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) y secuenciados en el laboratorio divisional de biología molecular (3130x/ Genetic Analyzer, Applied Biosystems, HITACHI).

Divergencia nucleotídica

Se calcularon los intervalos de valores de divergencia nucleotídica a nivel interespecífico e intergenérico, utilizando valores de distancia no corregidos “p” con el programa PAUP versión 4.0 para Macintosh (Swofford, 2001) (Anexo 9).

Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando los programas de cómputo: PAUP, Modeltest v 3.06 (Posada & Crandall, 1998) y MrBayes v.3.0 beta 4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), utilizando tres métodos para recuperar las posibles relaciones filogenéticas: máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y análisis bayesiano (AB), respectivamente.

Análisis máxima parsimonia.

Los árboles de máxima parsimonia (MP) fueron construidos con la opción de búsqueda heurística, utilizando la optimización ACCTRAN (Accelerated CharacterTransformation), caracteres sin ordenar y con igual peso. Las inserciones-delecciones fueron tratados como datos ausentes y quinta base. Se realizó una búsqueda heurística inicial para incrementar la verosimilitud del intercambio de ramas (*swapping*) dentro de las “islas” de árboles, lo que conduce a la mejor solución parsimoniosa (Maddison, 1991), consistente de 5000 adiciones de secuencias en forma aleatoria. Se retuvieron 25 árboles en cada paso, se guardaron árboles mínimos (MULPARS) y el intercambio de ramas se realizó con la opción de Tree - Bisection - Reconnection (TBR), con la opción de MULTREES (guardar múltiples árboles).

Análisis de máxima verosimilitud y bayesiano.

El programa Modeltest fue utilizado para encontrar el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos que más se ajustó a los datos en el análisis de ML, tratando a las inserciones-delecciones como datos ausentes. El modelo fue seleccionado utilizando dos criterios: la prueba de la razón de verosimilitud (LRT) y el criterio de información de Akaike, como está implementado en el programa Modeltest, con un nivel de significancia de 0.01. Cuando el modelo evolutivo fue encontrado se estimaron parámetros como: distribución gamma, proporción de sitios invariables, frecuencia y

proporción de bases. Con los modelos evolutivos estimados se corrieron posteriormente análisis bayesianos.

Se evaluó la estabilidad de las ramas internas en los cladogramas mediante análisis de bootstrap (B) (Felsenstein, 1985) implementado en PAUP, con 1000 réplicas. En el programa PAUP se calcularon además los índices de Consistencia (IC) y de homoplasia (IH) como resultado del análisis de MP. Los árboles fueron enraizados por comparación con el grupo externo, donde se incluyeron: *Thermosipo japonicus*, *Thermosipho sp.*, *Thermotoga marítima*, del orden Thermotogales, y *Petrotaga mobilis* del orden Petrotagales. Los grupos externos fueron seleccionados teniendo en cuenta dos criterios: relaciones filogenéticas cercanas con el grupo interno (Takai *et al.*, unpublished; Wery *et al.*, 2002; Cunliffe *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2007) y la disponibilidad de secuencias en la base de datos del GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Caracterización fisicoquímica

Variables ambientales del agua

Los resultados de las variables ambientales del agua se encuentran en la Tabla 2. La temperatura resultó ser homogénea en toda la laguna (Fig. 3) por lo que a nivel espacial no hubo grandes fluctuaciones, con un promedio de 26.97°C (19.84-31.30). En este caso no se obtuvieron diferencias significativas entre estaciones ($p < 0.05$).

Los promedios de temperatura (29.98°C, 20.86°C y 30.07°C) obtenidos en cada mes de muestreo no varían mucho, ya que las horas de muestreo fueron casi las mismas, por lo que es de esperarse que el máximo (31.30°C) sea en el mes de junio el cual corresponde a la época de secas, y el mínimo (19.84°C) corresponda a la época de nortes, en el mes de noviembre.

Durante el mes de noviembre se obtuvo el promedio mas bajo (20.86°C), siendo este un mes correspondiente a la época de nortes (Fig 3). La menor temperatura promedio registrada durante esta época climática se debió a que es frecuente la aparición de frentes fríos, acompañados de fuertes vientos y lluvia que provocan una importante disminución de la temperatura ambiente y del agua (Ayala-Pérez *et al.*, 2003).

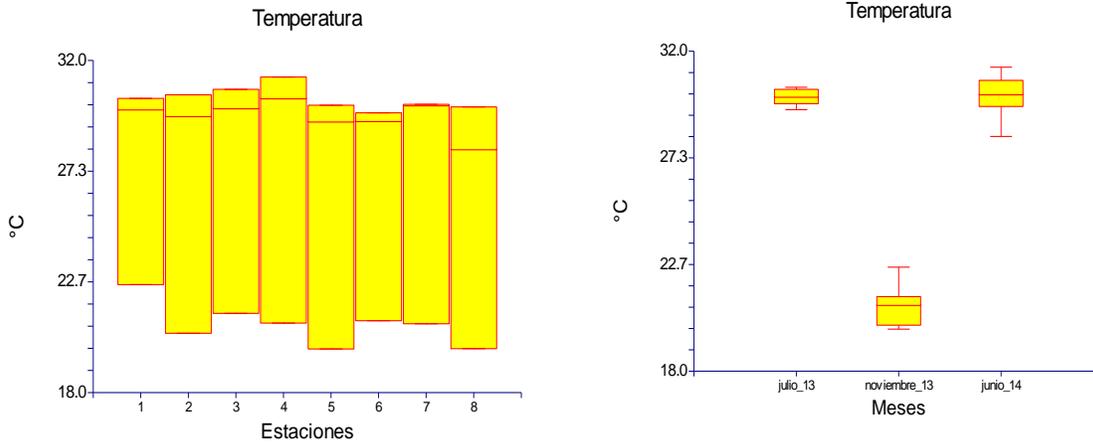


Figura 3. Variación espacial y temporal de la temperatura en la Laguna de la Mancha.

La salinidad a lo largo de la laguna tuvo un promedio de 24.98 ups, las primeras estaciones siendo afectadas por la descarga de los ríos y las últimas por la influencia de la marea. La laguna registró un intervalo de 16.46 a 35.90 ups, tendiendo el valor mínimo en el mes de junio y el máximo en julio. Los gradientes de salinidad son una característica común en las lagunas costeras ya que se presenta un intercambio de agua con el océano y la recepción de agua dulce proveniente de los ríos (Contreras, 2010). En este caso, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre estaciones, pero se observa un gradiente de salinidad al acercarnos a la boca de la laguna (Fig. 4). En las primeras estaciones se encuentra la zona de descarga del Río Caño Grande, por lo que la salinidad es un poco mas baja (min = 16.46), en las últimas estaciones la cercanía con el mar incrementa la salinidad. Además del efecto que tienen sobre la salinidad, las descargas fluviales también ocasionan que disminuya la transparencia, especialmente en las desembocaduras de los ríos (Varona-Cordero & Gutiérrez-Mendieta, 2003).

Durante el mes de noviembre de 2013 se registró la salinidad promedio menor (18.77 ups), seguido de junio de 2014 (26.96 ups), con julio de 2013 con el promedio más alto (29.22), Se esperaba que el mes de junio fuese en el que se obtuviera una mayor salinidad, debido a la evaporación ocasionada por temperaturas más altas y

poca profundidad de la laguna, pero no fue así, ya que se obtuvieron salinidades bajas con respecto a los demás meses. Esto podría deberse a que hay un constante dragado en la zona, además de que los muestreos se realizaron cuando la laguna se encontraba con la boca abierta, por lo que existía una mayor mezcla de salinidades en la laguna. Además, en junio de 2014 se registraron 124.2 mm de lluvia, 19% por arriba del promedio histórico de junio (1941-2013), debido a seis ondas tropicales, la tormenta tropical Boris y el huracán Cristina. Las entidades donde se registró el mayor número de días con registros máximos de lluvia en 24 horas entre 85 y 255 mm durante este mes fueron Veracruz y Oaxaca con siete y seis días respectivamente (CONAGUA, 2014).

Las lluvias en la primera parte del verano de 2013 ocurrieron por debajo del promedio histórico, pero a partir de septiembre se registró un excelente repunte y la segunda mitad del año fue una de las más húmedas (CONAGUA, 2013) lo que podría explicar el aumento de salinidad durante el mes de julio de 2013.

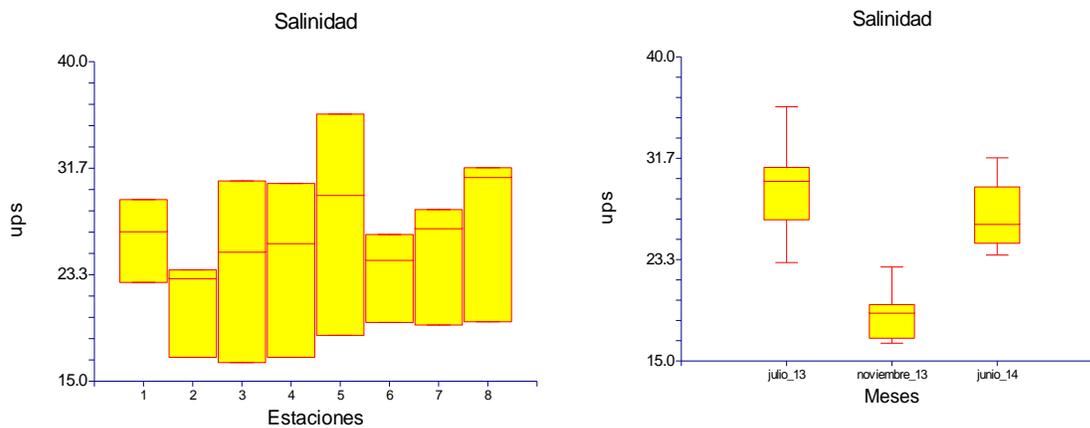


Figura 4. Variación espacial y temporal de la salinidad en la Laguna de la Mancha.

Tabla 2. Variables ambientales en agua. Promedio \pm desviación estándar (Mínimos - Máximos)

Variable	jul-13	nov-13	jun-14
Temperatura (°C)	29.90 \pm 0.34 (29.44 - 30.42)	20.87 \pm 0.87 (19.84 - 22.50)	30.07 \pm 0.91 (28.27 - 31.30)
Salinidad (ups)	29.98 \pm 0.34 (23.09 - 35.90)	18.77 \pm 2.07 (16.46 - 22.73)	26.96 \pm 2.74 (23.71 - 31.70)
pH	8.52 \pm 0.37 (7.83 - 8.89)	7.13 \pm 0.45 (6.26 - 7.89)	7.68 \pm 0.50 (6.8 - 8.6)
O ₂ (mg/l)	4.31 \pm 1.35 (2.65 - 5.89)	7.17 \pm 2.59 (1.06 - 9.41)	5.61 \pm 2.35 (1.5 - 8.32)
Profundidad (m)	1.18 \pm 0.55 (0.6 - 2.2)	1.7 \pm 0.51 (1.1 - 2.8)	0.99 \pm 0.50 (0.4 - 1.9)
Transparencia (m)	0.63 \pm 0.07 (0.5 - 0.7)	0.63 \pm 0.14 (0.5 - 0.8)	0.52 \pm 0.28 (0.0 - 0.9)

En cuanto el comportamiento del pH del agua, se obtuvo un promedio de 7.78 a lo largo de la laguna, teniendo un intervalo que va desde 6.26 obtenido en el mes de noviembre de 2013, hasta 8.89 obtenido en el mes de julio de 2013. No se encontraron diferencias significativas a nivel espacial (Fig. 5).

En zonas costeras el pH depende de la influencia marina, de los escurrimientos, precipitación, vegetación circundante, circulación, actividad biológica de algunos organismos y del origen de los suelos. Sin embargo, los procesos biológicos (fotosíntesis y respiración), la turbulencia y aireación son los que principalmente influyen en el pH, por la variación de dióxido de carbono (De LaLanza-Espino, 1994).

Las estaciones en las que el pH llegó a ser ligeramente alcalino fueron las más cercanas a la boca de la laguna, donde el valor máximo registrado es de 8.89. Los cambios entre estaciones pudieran estar relacionados con el ciclo de las mareas vivas y muertas: las primeras ocasionan aumentos en el pH, por el aporte de agua

marina, mientras que las segundas ocasionan el proceso contrario, por la influencia del aporte de la materia orgánica y metabolitos del estero. La fluctuación es muy poca y se mantiene en un pH neutro, por lo que no suele interferir con la composición o distribución de las bacterias (Valdez-Holguín, 1993).

A escala temporal, el pH en época de nortes y secas fue ligeramente ácido, causado probablemente por el aumento repentino en las lluvias de mitad de año. Es importante mencionar que el pH puede influir directamente en la abundancia de la microbiota anaerobia, ya que consigue limitar la disponibilidad de nutrientes esenciales para su crecimiento (Atlas & Bartha, 1992) (Figura 5).

Los valores de pH fueron similares a los reportados por Salazar Chavez (2008) en las lagunas de Aguas blancas y Aguas negras (ecosistemas tropicales también), en las que los valores registrados de pH se encontraron en un intervalo de 5.8 a 7.2.

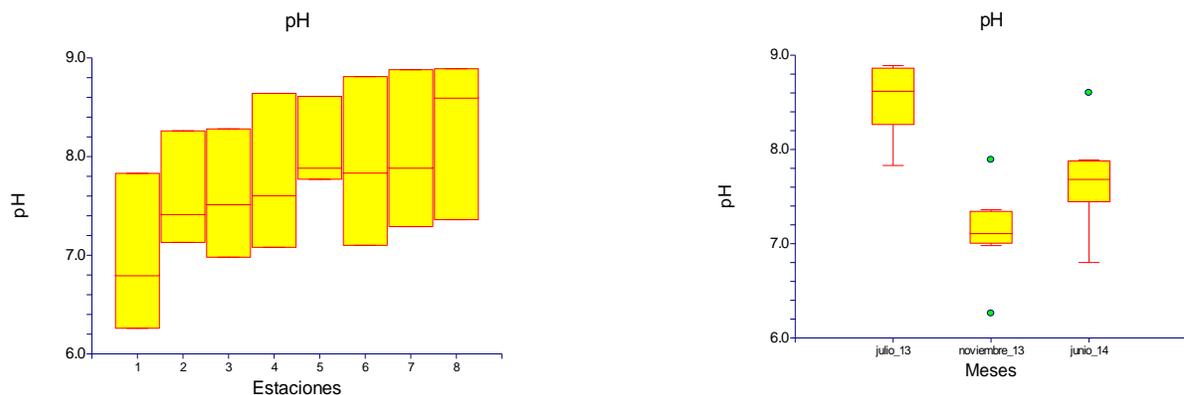


Figura 5. Variación espacial y temporal del pH en la Laguna de la Mancha.

El oxígeno disuelto se mantuvo bajo, con un mínimo de 1.06, un máximo de 9.4 y un promedio de 5.69 mg/l en toda la laguna. Los valores mínimos se localizaron en las primeras estaciones. No se encontraron diferencias significativas entre estaciones (Fig. 6). En julio de 2013 se obtuvo un promedio de 4.31, en noviembre de 2013 7.17 y en junio de 2014 5.6 mg/l.

Vander Leeden *et al.* (1990) mencionaron un mínimo de 2.0 mg/l, condiciones consideradas de hipoxia (OD <2 mg/l) que sólo se encontraron en el presente trabajo en la estación 1 durante los meses de noviembre de 2013 y junio de 2014.

Durante la época de secas, la concentración de OD fue mayor que en los meses siguientes. No obstante, la diferencia entre noviembre y junio no fue mucha (Fig. 6). De acuerdo con Flores-Verdugo *et al.*, (1990), estos valores pueden estar relacionados con el gran aporte de nutrientes y materias húmicas que en época de lluvias ingresan a estos sistemas, además de las temperaturas bajas en la superficie del agua y de los vientos del norte presentes en esta época, que provocan un mayor oleaje y mezcla aumentando la probabilidad de que la superficie de la columna del agua se encuentre saturada o sobresaturada de oxígeno.

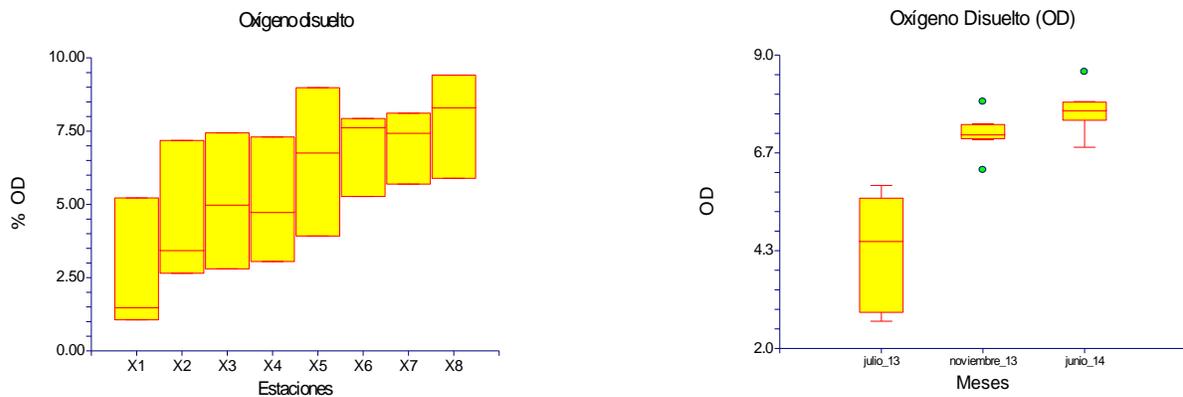


Figura 6. Variación espacial y temporal del oxígeno disuelto en la Laguna de la Mancha.

El promedio de la profundidad de la laguna fue de 1.3 m, teniendo su máximo en la estación 5 (2.8 m.), Dado que un río pasa justo por debajo de dicha estación, era de esperarse que en la estación “El Cruce” se obtuviera la mayor profundidad. Al realizarse la prueba estadística de ANOVA, se encontraron diferencias significativas entre estaciones ($p=0.008672$) (Fig 7).

Durante el mes de junio de 2013 se encontró el promedio menor de profundidad (0.4 m), lo que pudiera ser debido a las altas temperaturas y evaporación que se genera en la laguna. Y siendo esta tan somera, en ocasiones llega a ser visible el fondo.

La transparencia se mantuvo constante, con variaciones desde 0.9 m hasta 0 (es decir, en estas estaciones no se lograba observar el disco de Secchi a simple vista sobretodo cerca de la boca de la laguna, donde existe mayor cantidad de arenas y hay un mayor oleaje). Aunque está descrito que las descargas fluviales también ocasionan que disminuya la transparencia, especialmente en las desembocaduras de los ríos (Varona-Cordero & Gutiérrez, 2003), en este trabajo la menor visualización se obtuvo en las estaciones cercanas a la boca (Fig 7). Los promedios en los diferentes meses no variaron mucho, siendo el mes de julio de 2013 con 0.63 m el mes con el mayor promedio y junio de 2014 (0.52) el de menor promedio.

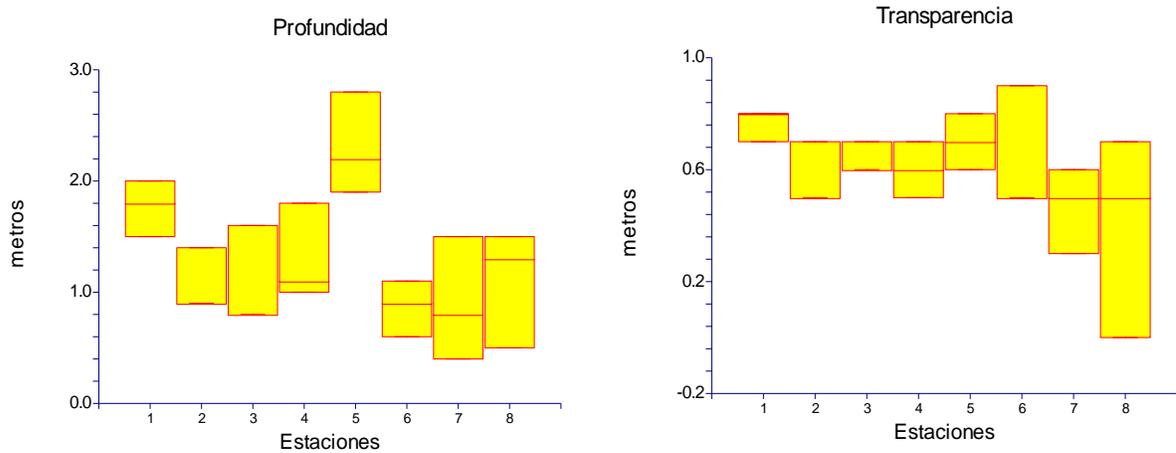


Figura 7. Variación espacial y temporal de la profundidad y transparencia en la Laguna de la Mancha.

VARIABLES AMBIENTALES DEL SEDIMENTO

Tabla 3. Variables ambientales del sedimento. Promedio \pm Desviación estándar (Mínimos - Máximos)

Variable	jul-13	nov-13	jun-14
Arena (%)	76.75 \pm 17.21 (52.14 - 98.55)	68.10 \pm 26.47 (15.98 - 98.79)	74.3 \pm 21.36 (26.0 - 93.0)
Limo (%)	16.51 \pm 14.59 (0.73 - 44.71)	22.27 \pm 24.22 (0.61 - 76.11)	17.1 \pm 15.02 (3.0 - 51.0)
Arcilla (%)	6.63 \pm 5.40 (0.72 - 17.68)	9.53 \pm 5.42 (0.6 - 19.73)	8.5 \pm 5.97 (2.0 - 19.0)
Carbono orgánico (%)	3.71 \pm 1.43 (1.18 - 5.21)	3.11 \pm 1.81 (0.22 - 5.24)	4.28 \pm 1.96 (0.87 - 5.99)
Sólidos volátiles (%)	11.04 \pm 6.07 (0.60 - 21.71)	49.90 \pm 19.36 (8.36 - 74.98)	8.48 \pm 3.32 (4.39 - 14.26)
Sólidos fijos (%)	88.96 \pm 6.07 (78.29 - 99.40)	50.10 \pm 19.36 (25.02 - 91.63)	91.51 \pm 3.32 (85.73 - 95.60)
Carbohidratos	5.41 \pm 0.92 (4.29 - 6.36)	5.77 \pm 1.22 (4.37 - 7.38)	7.16 \pm 2.52 (4.42 - 10.89)

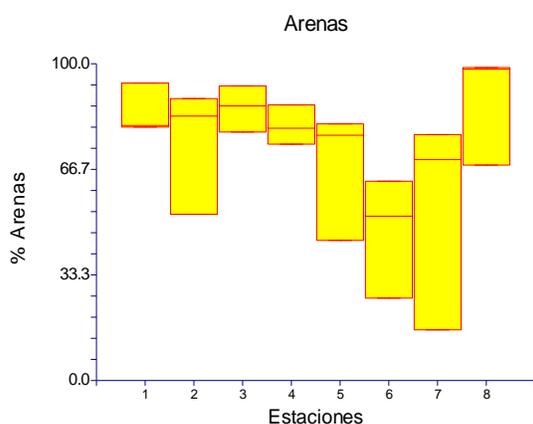
Granulometría

La textura de sedimentos entre las diferentes estaciones analizadas no presentó diferencias significativas entre los principales tipos de grano: arenas y limos, exceptuando en arcillas ($p= 0.029463$). Esto pudiese ser debido al cambio que se da sobre todo en las estaciones 6,7 y 8 ,en donde el porcentaje de fracciones finas aumentó, lo cual indicó ambientes muy heterogéneos, con variación hidrodinámica a nivel espacial (Fig. 8c). Cabe recordar que la mezcla de arenas, limos y arcillas, en

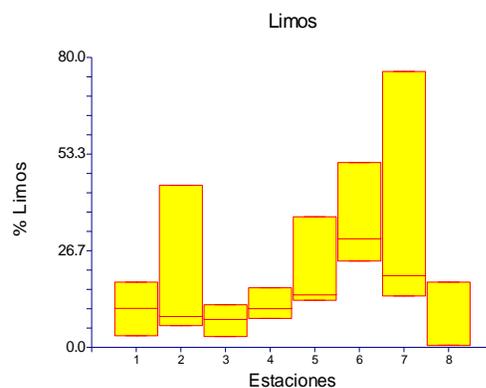
diferentes proporciones, es característica de zonas someras y cercanas a la costa (Poppe *et al.*, 2000). Un aspecto destacado de la laguna de La Mancha, es que las arenas estuvieron conformadas por arenas finas ($\phi = 3.0$).

A nivel espacial, se observa cierta tendencia desde la estación 1 hacia la 8 (Fig. 8a): las arenas disminuyen hacia la boca de la laguna y ocurre un efecto inverso en los limos (Fig. 8b) y, sobre todo, las arcillas (Fig. 8c).

a.



b.



c.

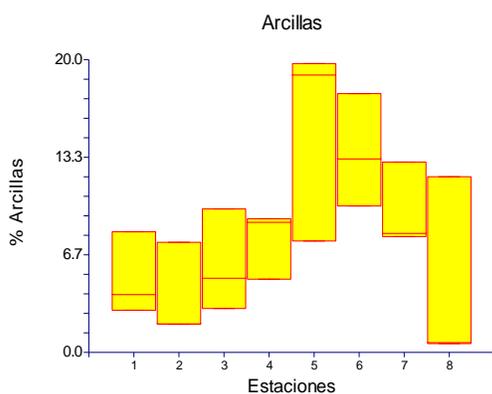


Fig 8. Distribución espacial de sedimentos en la laguna de La Mancha. (a: Arenas finas, b: Limos, c: Arcillas).

El análisis granulométrico mostró que el componente principal en el sistema lagunar son las arenas finas, teniendo un promedio de 73.03%, presentándose los mayores porcentajes en las bocas de comunicación con el mar así como en zonas cercanas a éstas o con mayor influencia marina. Lo anterior corrobora lo reportado por Flemming (2000) quien mencionó que los sistemas arenosos indican depositación bajo condiciones de alta energía.

Respecto a la fracción fina, los limos obtuvieron 18.67% en promedio, mientras que las arcillas 8.22%. Estos sedimentos se encuentran asociados a zonas someras, así como a aportes fluviales, en las cuales se depositan bajo condiciones de baja energía (Fig. 9).

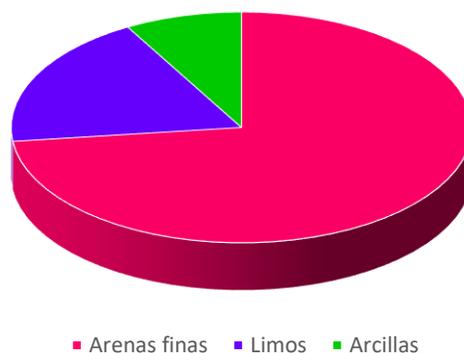
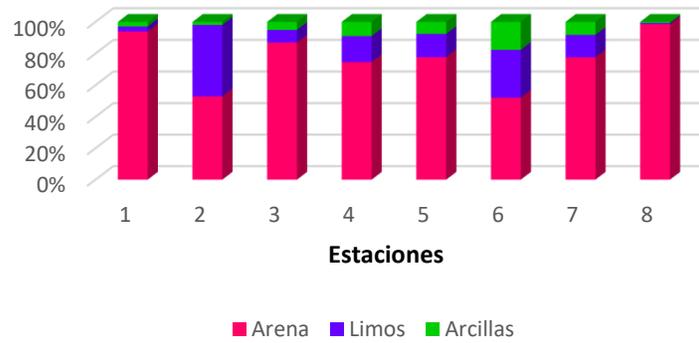


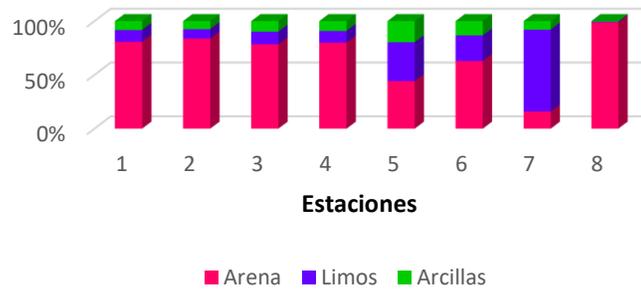
Fig. 9. Distribución general de sedimentos en la Laguna de La Mancha.

En general, los sedimentos de textura más gruesa se distribuyeron en la zona de aporte de ríos. Galván *et al.*, (1999), mencionan que el tipo de sedimento puede ser un indicador fundamental del nivel energético de las corrientes de un medio de depósito: cuánto más grueso es el tamaño de grano, más alto es el nivel energético de la corriente que lo depositó. En el sistema lagunar existió una mayor influencia de las corrientes de los ríos en la zona de manglar donde se registró el mayor contenido de arenas finas. Sin embargo, hubo un aumento en la estación 8, la cual es influenciada por la marea y actividades antropogénicas como el dragado de la laguna, lo que genera un aumento en las arenas, y cierta homogeneidad en la laguna (Fig. 10).

a)



b)



c)

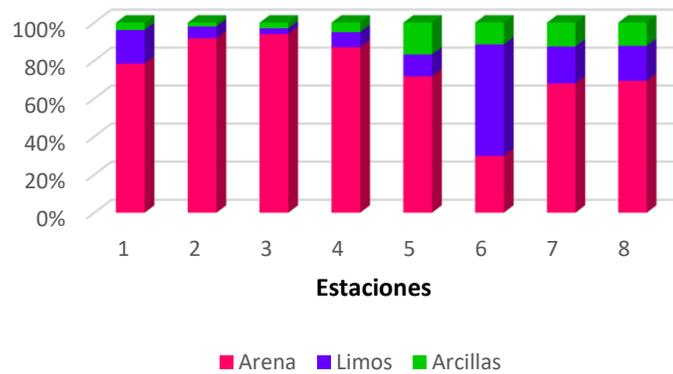


Fig. 10. Distribución espacio-temporal de arenas, limos y arcillas en los sedimentos de la laguna de la Mancha (a:julio-2013, b:noviembre-2013, c:junio-2014).

El mes con mayor cantidad de arenas fue julio de 2013 (76.75%), seguido de junio de 2014 (74.30%), probablemente debido a que existe un mayor escurrimiento por los aportes fluviales de los ríos. Recordando que durante el mes de junio de 2014 las lluvias fueron mayores a lo normal, esto provoca que junio tenga mayores cantidades de arenas finas a diferencia de noviembre de 2013 (68.10%) (Fig. 10).

En cuanto a la materia orgánica, en los estuarios y lagunas costeras ésta proviene de fuentes autóctonas y alóctonas (Eatherall *et al.*, 1998). Las primeras incluyen el fitoplancton, fitobentos, bacterias, macroalgas, pastos, marismas, detritus de manglares y excreciones y restos de animales (peces, crustáceos y moluscos, entre otros) (Flores-Verdugo *et al.*, 1990). Las fuentes alóctonas incluyen el material continental erosionado, lixiviado y los aportes antropogénicos, como las descargas industriales y municipales, que llegan a los ambientes litorales principalmente a través de los ríos y drenajes (Preston & Prodduturu, 1992). Su caracterización química ha involucrado la evaluación del carbono orgánico (CO), el cual representa una fracción de ésta (Libes, 2011).

El CO presentó un promedio de 3.70%, con un mínimo de 3.11% durante el mes de noviembre de 2013 y un promedio máximo de 4.28%, registrado en el mes de junio de 2014 (Tabla 3). El CO fue mayor en las primeras estaciones, lo que se podría deber al aporte de los ríos que se encuentran cercanos a dicha zona, así como el aporte de los manglares, los cuales son trampas de carbono dentro de una laguna. Existe un gradiente inverso hacia la boca, por lo que en la estación 8 siempre se obtuvo el porcentaje menor de CO. Esto también es debido al tipo de sedimento, el cual es completamente arena al acercarse a las estaciones cercanas a la boca, además del hecho de que la boca se encontraba abierta en todos los muestreos, por lo que hubo remoción de sedimentos que provocaron así el movimiento de las arenas características de la zona.

En este caso sí se obtuvieron diferencias significativas entre estaciones ($p=0.000025$) (Fig. 11). Valette-Silver (1993) reportó que existe una relación inversamente proporcional entre la distribución de la materia orgánica y el tamaño de grano, de modo que a menor tamaño de grano hay mayor acumulación de materia

orgánica, en este trabajo el tamaño de grano es mayor en las estaciones donde la cantidad de CO es mayor, por lo que la relación es directa. Gutiérrez-Aguirre *et al.*, (2000) mencionaron que los valores altos de CO en las zonas estuarinas se asocian con el aporte de materia orgánica derivada de la presencia de pastos marinos y manglar. Dado que en toda la laguna está rodeada de manglar, y en las primeras estaciones las muestras fueron tomadas mucho más cerca de este, existe un aumento en el CO de dichas estaciones. Aunado a lo anterior, en dichas estaciones se encontraron sedimentos finos, en los que se incrementa la capacidad de adsorción debido al aumento del área superficial de las partículas (Pope *et al.*, 2000).

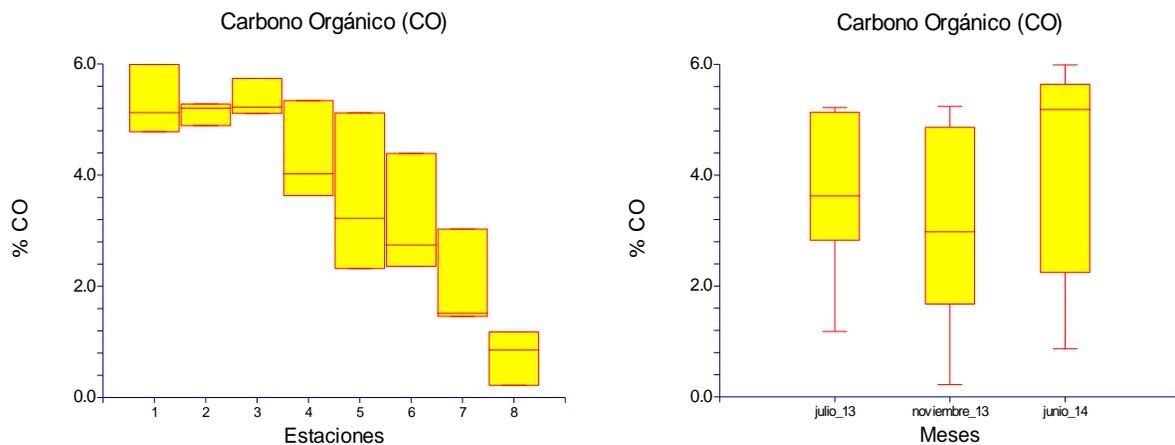


Figura 11. Variación espacial y temporal del CO en la Laguna de la Mancha.

Los porcentajes mayores de CO se obtuvieron durante el mes de junio de 2014, con 4.28%, seguida de julio de 2013, con 3.71%. Los menores en noviembre de 2013, con 3.11%. En julio las principales fuentes de CO fueron las descargas de los ríos, las cuales incrementan el contenido de CO en esta época. Como ya se mencionó anteriormente, durante el mes de junio de 2014 hubo un incremento de lluvias en el país, por lo que justifica el hecho de que en ese mes haya habido un incremento en el contenido de CO (Fig. 11). Además, en los meses con mayores temperaturas, el agua presenta poco movimiento, lo que provoca un inmediato y substancial enriquecimiento orgánico de los sedimentos (Mendes *et al.*, 2012). Llegados a este

punto, hay que considerar el hecho de que un excesivo enriquecimiento de CO de los sedimentos puede ocasionar una baja considerable de oxígeno, producción de sulfuro de hidrógeno y por ende, el colapso de la macrofauna bentónica (Díaz & Rosenberg, 1995; Levin *et al.*, 2009).

Dado que el CO y los carbohidratos son aportados a la zonas costeras principalmente por materia vegetal (ya sea autóctona, como raíces y hojas de pastos) o por la vegetación alóctona que es adyacente al sistema (entre ésta las marismas y los manglares), los principales aportes en la laguna son la zona de ríos, en la que se obtuvieron los valores más altos (Fig. 12).

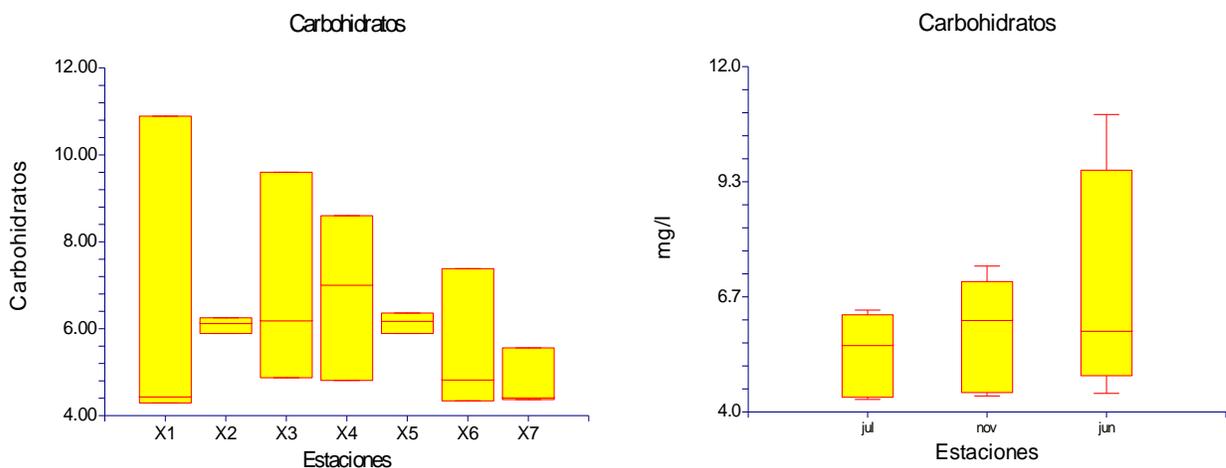


Figura 12. Variación espacial y temporal de carbohidratos en la Laguna de la Mancha.

En lo que se refiere a los carbohidratos, éstos ingresan a la fase sedimentaria no sólo a través de las diversas fuentes establecidas anteriormente, sino también como producto de las transformaciones efectuadas por los microorganismos durante la mineralización de la materia orgánica. Al mismo tiempo, los carbohidratos son utilizados por la microbiota presente en el ecosistema (bacterias y hongos, principalmente) como fuente de energía y a través de la actividad microbiana pueden ser incorporados en biomasa o ser transformados metabólicamente en polímeros complejos que contribuyen a la formación de compuestos refractarios. Los

carbohidratos constituyen una fracción fundamental del carbono orgánico, contribuyen entre el 14% y el 21% de éste en un estuario (Preston & Prodduturu, 1992; Borsheim *et al.*, 1999). Las diferencias en concentración de carbohidratos entre las estaciones fueron pocas: el valor mínimo se obtuvo durante el mes de julio de 2013 (4.43 mg/l) en la estación 6 y el máximo (10.89) en la estación 1 durante el mes de junio de 2014. No se encontraron diferencias significativas entre estaciones, sin embargo al igual que en el CO se observa (Fig. 12) que hay un decremento en la concentración de carbohidratos hacia la zona de la boca de la laguna. Todo sugiere que en la distribución de los constituyentes carbonados de la materia orgánica en la laguna están relacionados diversos factores, como ha sido establecido por otros autores (Al-Ghadban *et al.*, 1994), entre los que destacan los patrones de circulación, la distribución de los sedimentos, el tamaño de grano de los mismos y los aportes alóctonos y autóctonos de materia orgánica.

Los sólidos fijos (SF) tampoco tuvieron diferencias significativas a nivel espacial, sin embargo los mayores porcentajes se obtuvieron cercanos a la boca de la laguna. La concentración de sólidos fijos (fracciones inorgánicas), representó el 76.22% a nivel temporal.

La concentración de sólidos volátiles (SV) no exhibió diferencias significativas entre estaciones, aunque durante el mes de noviembre de 2013 existe un incremento importante en los mismos, obteniéndose en este mes un promedio de 49.90% de SV, mientras que en julio de 2013 fue de 11.04 y en junio de 2014 de 8.48 (Fig. 13). El mes de noviembre corresponde a la época de nortes, por lo que es posible que este incremento se deba a la acción de los vientos fríos y al hecho de que la boca ha permanecido abierta, lo que incrementa la concentración de fracciones orgánicas.

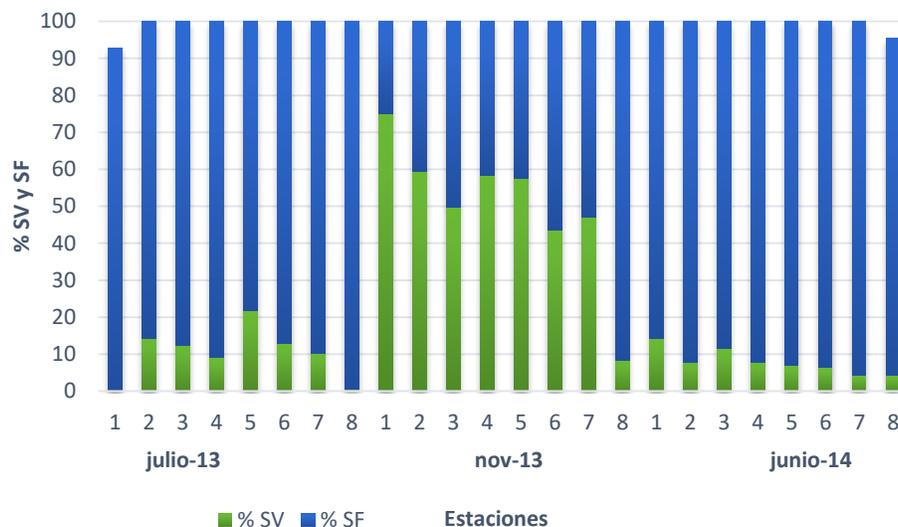


Figura 13. Variación espacial y temporal de sólidos volátiles y fijos en la Laguna de la Mancha.

Correlación

Se realizó una transformación logarítmica de los datos, por lo que se justifica la normalidad de los mismos. Al realizar el análisis de correlación de Pearson se concluyó que existen diferencias significativas entre ciertas variables (Tabla 4).

Tabla 4. Correlaciones ambientales en la Laguna de la Mancha. ($p < 0.05$).

Variable 1	Variable 2	H
Salinidad	Temperatura	0.84
pH	Salinidad	0.61
Limos	Arenas	-0.83
Sólidos Volátiles	Temperatura	-0.84
Sólidos Volátiles	Salinidad	-0.75
Sólidos Volátiles	Profundidad	0.66
Carbohidratos	Carbono	0.63
	Orgánico	
Carbohidratos	Sólidos Fijos	0.63

La salinidad tuvo una correlación positiva con la temperatura y el pH, además de tener una correlación negativa con los sólidos volátiles. Al haber mayor temperatura, existe cierta evaporación en la laguna, por lo que la salinidad aumenta, y dado que el pH depende sobretodo de las mareas (y por lo tanto de la influencia marina), es de esperarse que ambos tengan un aumento al acercarnos a la boca de la laguna.

Los sólidos volátiles tuvieron una correlación positiva con la profundidad y una correlación negativa con la temperatura y la antes mencionada salinidad.

Los carbohidratos, en cambio, tuvieron correlación positiva con el carbono orgánico y los sólidos fijos (Fig. 15). Se ha mencionado antes que el CO y los carbohidratos son aportados principalmente por materia vegetal autóctona o por vegetación alóctona adyacente al sistema, por lo que ambos disminuyen al acercarnos a la boca de la laguna. Sus máximos se encuentran en las primeras estaciones, en donde la cantidad de materia orgánica es mayor.

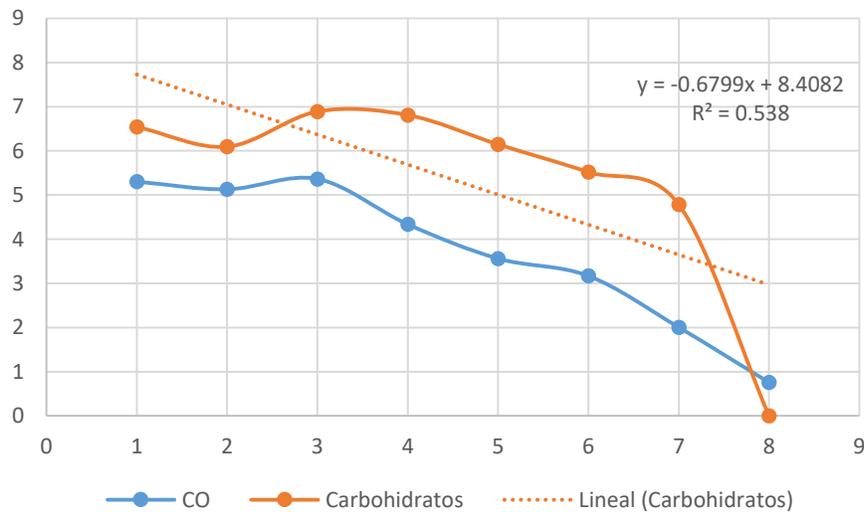


Figura 15. Correlación entre CO y Carbohidratos en la laguna de La Mancha.

El tamaño de grano es de suma importancia en las lagunas costeras, en este caso observamos como a pesar de tratarse de arenas finas, éstas tienen una correlación negativa con los limos, ya que los limos van disminuyendo al acercarnos a las primeras estaciones, en donde la cantidad de arenas finas es mayor debido al nivel energético de la corriente.

Caracterización microbiana

Análisis moleculares

a) Extracción

Como resultado de la extracción de ADN, se obtuvo un producto con un tamaño aproximado de 10,000 pb, el cual fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con buffer TAE 1x (Fig. 16).

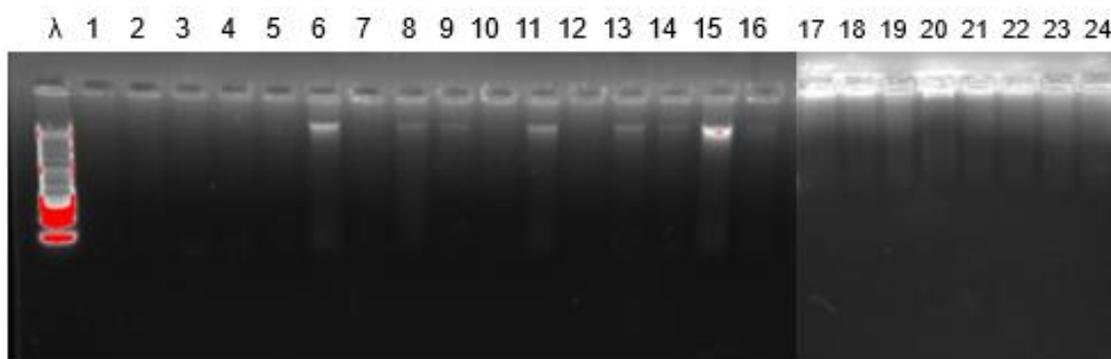


Figura 16. Resultado de la extracción de ADN total de las muestras de los sedimentos de la laguna de la Mancha, Veracruz.

Carriles: λ = marcador de tamaño 1 kb; 1 = 1N, 2 = N2, 3 = 3N, 4 = 4N, 5 = 5N, 6 = 6N, 7 = 7N, 8 = 8N, 9 = 1J, 10 = 2J, 11 = 3J, 12 = 4J, 13 = 5J, 14 = 6J, 15 = 7J, 16 = 8J, 17 = 1JU, 18 = 2JU, 19 = 3JU, 20 = 4JU, 21 = 5JU, 22 = 6JU, 23 = 7JU, 24 = 8JU.

Claves: N = noviembre de 2013, J = julio de 2013, JU = junio de 2014.

El ADN extraído posteriormente fue cuantificado en un Nanodrop 2000, obteniéndose las concentraciones que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de ADN obtenido en el sedimento de la laguna de la Mancha, Veracruz.

Muestra	ng/ μ l	Muestra	ng/ μ l	Muestra	ng/ μ l
1N	1.5	1J	2.2	1JU	157.9
2N	5.9	2J	3.7	2JU	127.7
3N	2.7	3J	4.3	3JU	115.8
4N	9.1	4J	3.9	4JU	213.2
5N	1.2	5J	12.2	5JU	124.8
6N	1.2	6J	2.8	6JU	127.6
7N	4.5	7J	8	7JU	120.7
8N	1.5	8J	2.1	8JU	123.9

b) PCR anidada

Con el ADN obtenido a partir de la extracción, se procedió a realizar la primera PCR, obteniéndose un fragmento de 1384 pb. Como se observa en la figura 17, las muestras correspondientes al mes de junio de 2014 tuvieron una correcta amplificación del fragmento de ADN, sin embargo para las muestras de julio y noviembre de 2013 fue necesario la adición de un coadyuvante (DMSO) para su correcta amplificación. Aún así, las muestras correspondientes al mes de julio de 2013 no pudieron amplificarse, por lo que se eliminaron de los futuros análisis moleculares. Tampoco se consideraron las muestras de la estación 8 de cada muestreo, donde la calidad del ADN no fue buena porque desde el proceso de extracción el ADN se encontraba fragmentado, lo que dificulta su amplificación y la reproducibilidad de las técnicas (Cornejo *et al.*, 2014).

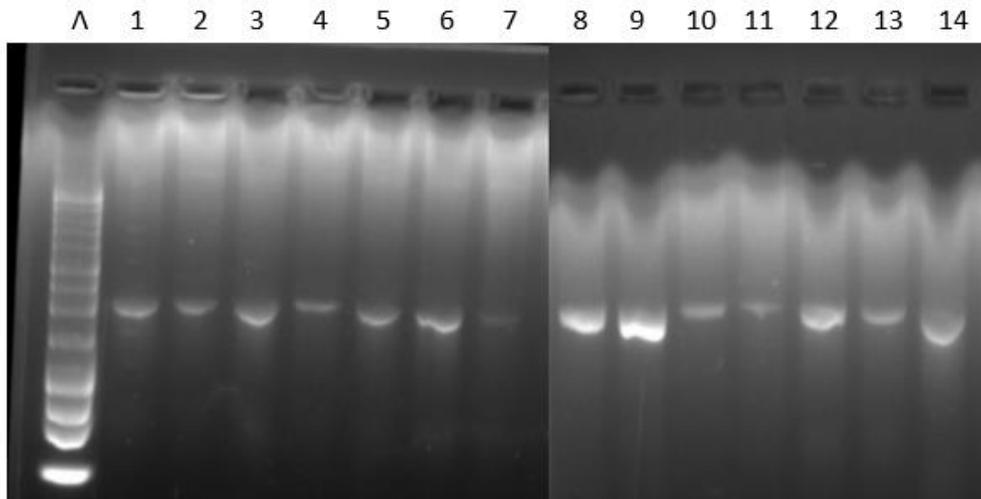


Figura 17. Resultado de la primera PCR. Muestras de los sedimentos de la laguna de la Mancha, Veracruz.

Carriles: λ = marcador de tamaño 1 kb; 1= 1N, 2 = 2N, 3 = 3N, 4 = 4N, 5 = 5N, 6 = 6N, 7 = 7N, 8= 1JU, 9 = 2JU, 10 = 3JU, 11 = 4JU, 12 = 5JU, 13 = 6JU, 14 = 7JU.

Claves: N = noviembre de 2013, J = julio de 2013, JU = junio de 2014.

Posteriormente se llevó a cabo una segunda PCR con la finalidad de reducir el tamaño del fragmento, y con esto aumentar la sensibilidad y la especificidad así como evitar hibridaciones inespecíficas de los cebadores. En este caso se obtuvo un fragmento con un tamaño aproximado de 322 pb (Fig. 18).

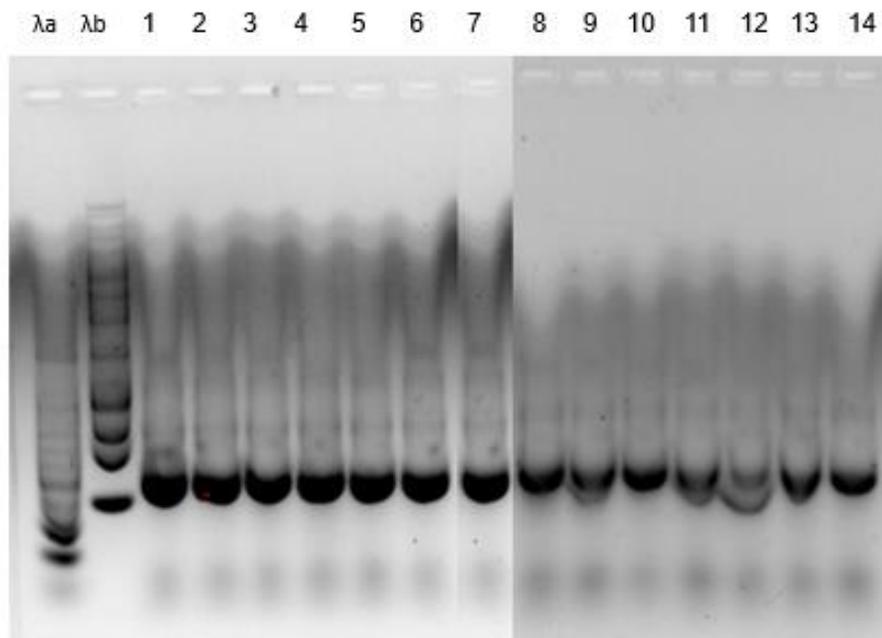


Figura 18. Segunda PCR de los sedimentos de la Laguna de la Mancha, Veracruz.

Carriles: λa = marcador de tamaño 100 bp , λb = marcador de tamaño 1kb, 1 = 1N, 2 = 2N, 3 = 3N, 4 = 4N, 5 = 5N, 6 = 6N, 7 = 7N, 8 = 1JU, 9 = 2JU, 10 = 3JU, 11 = 4JU, 12 = 5JU, 13 = 6JU, 14 = 7JU.

Claves: N = noviembre de 2013, J = julio de 2013, JU = junio de 2014.

c) DGGE

Los perfiles de DGGE no mostraron un alto número de bandas dominantes para los sitios de muestreo durante los diferentes meses. Se obtuvieron un total de 27 bandas (Fig. 19).

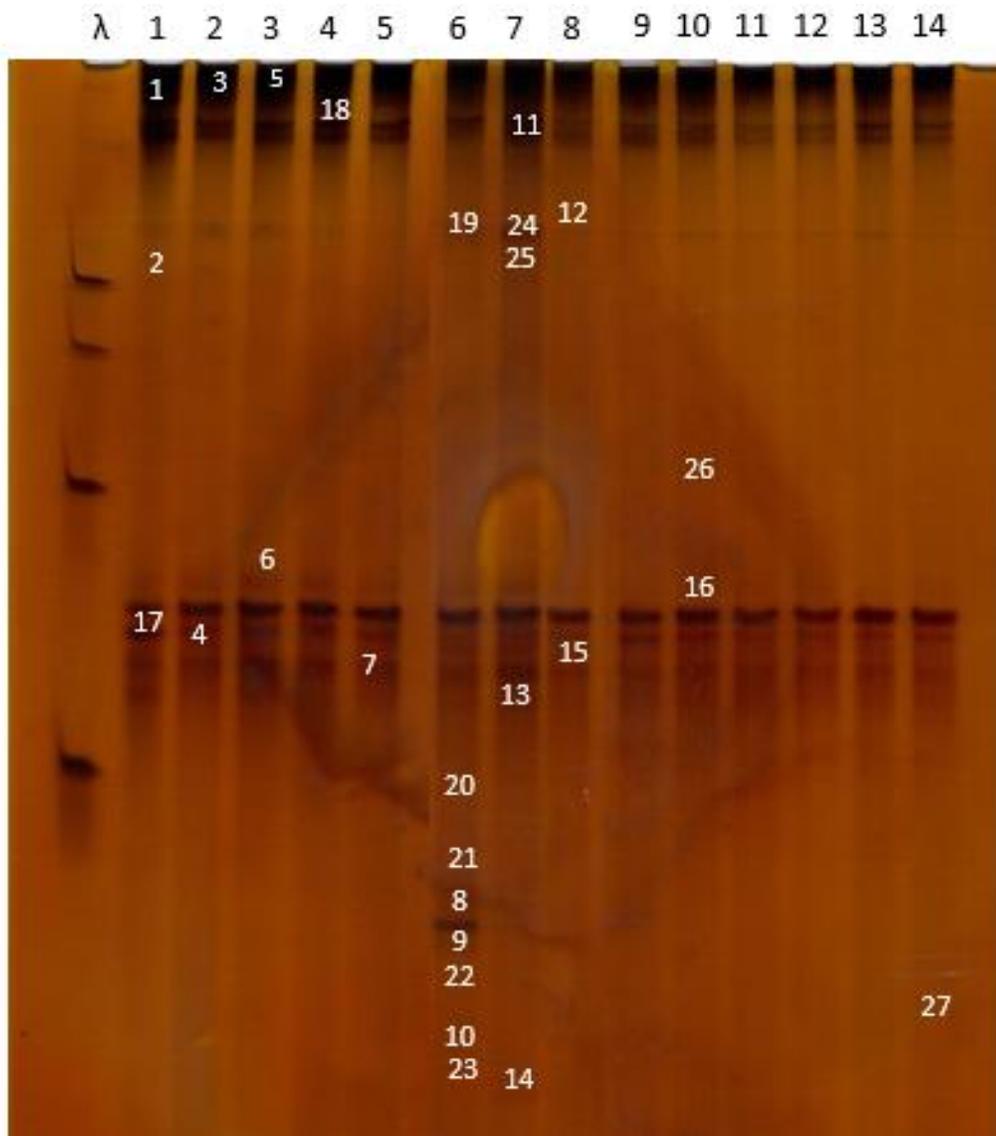


Figura 19. Visualización de gel de DGGE a partir de fragmentos del 16S rADN obtenidos por PCR para muestras colectadas en la Laguna de La Mancha.

Carriles: λ =marcador de tamaño, 1 = 1N, 2 = 2N, 3 = 3N, 4 = 4N, 5 = 5N, 6 = 6N, 7 = 7N, 8 = 1JU, 9 = 2JU, 10 = 3JU, 11 = 4JU, 12 = 5JU, 13 = 6JU, 14 = 7JU.

Claves: N = noviembre de 2013, JU = junio de 2014.

No todas las bandas se distribuyeron de la misma manera. Las bandas 1-5, 11, 12, 13 y 15-19, se encontraron en todas las estaciones de ambos muestreos. Las bandas 6 y 7 se encuentran en todas estaciones, pero sólo en el mes de noviembre de 2013. Las bandas 8, 9, 10 y 20 a 23 se encuentran sólo en la estación 6 (lugar en donde se localiza el río que pasa por la Laguna) y el mes de noviembre de 2013. En esta estación es donde apareció un mayor número de bandas.

En la estación 7 y el mes de noviembre de 2013 se encontraron las bandas 14, 24 y 25. Esta estación es la más cercana a la boca de la laguna, por lo que existe una salinidad mayor.

También se encontraron bandas localizadas en un solo punto de la laguna, por ejemplo la banda 26 que se encontró en la estación 3 en el mes de junio de 2014, y la banda 27 que se localiza en la estación 7 en ese mismo mes.

La banda 17 no tuvo similitud con ninguna secuencia registrada en el GenBank.

Los patrones de bandas de los sedimentos obtenidos en las estaciones 6 y 7 (las estaciones más cercanas a la boca de la laguna) y el mes de noviembre de 2013 revelaron una estructura de comunidad diferente, además de un aumento en el número de bandas.

Uraka *et al.*, (1999) y Zhang *et al.*, (2008a,b) mencionaron que las bacterias en los sedimentos marinos presentan heterogeneidad espacial en términos de abundancia, diversidad y actividad, en dimensiones tanto horizontal como vertical. Esto es contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, donde no se encuentran grandes diferencias entre las estaciones analizadas. Las pocas diferencias en la estructura de la comunidad de los sedimentos analizados podrían atribuirse a bandas que no fueron detectadas en las muestras analizadas (tal vez el gradiente de urea utilizado durante el DGGE fue demasiado amplio y no permitió la correcta separación de todas las muestras), o sean efecto del sesgo asociado a la técnica de PCR, esto es, diferencias en el número de copias de los genes o heterogeneidad del 16S rADN dentro de las especies (Araya *et al.*, 2008).

Sin embargo, existen otros factores que podrían haber afectado la distribución y diversidad de los organismos. Estos podrían ser los primers utilizados, los cuales no fueron lo suficientemente específicos para lograr una correcta amplificación del ADN, además el hecho de que las muestras sean de sedimento, vuelve aún más compleja la extracción de los ácidos nucleicos, esto debido a la gran cantidad de contaminación de origen de las mismas, así como la gran cantidad de ácidos húmicos presentes en dicho sistema lagunar.

Otro factor, podría deberse a que las comunidades bacterianas se mantienen constantes a pesar de los cambios fisicoquímicos del ambiente. De acuerdo con Gilbert *et al.*, (2012), la dinámica de las comunidades microbianas marinas en diversas épocas del año, aparentemente está más relacionada con aspectos biológicos (relaciones con otros organismos) más que con factores fisicoquímicos, coincidiendo con los resultados en este trabajo.

El patrón de bandas del DGGE se considera la huella genética de la comunidad microbiana e idealmente cada banda representa a un miembro de la comunidad. (Cornejo *et al.*, 2014). Gracias a esta técnica, es posible identificar a cada uno de los microorganismos que integran a esta comunidad bacteriana. Sin embargo, la resolución de los perfiles DGGE, en términos de número de bandas, no siempre es suficiente para ilustrar la considerable diversidad bacteriana en comunidades indígenas y algunos estudios han demostrado que fragmentos de diferentes secuencias pueden migrar en la misma posición (Ranjard *et al.*, 2000). Probablemente las bandas que no tuvieron significancia en el Blast fueron aquellas en donde no hubo suficiente ADN o se encontraba muy degradado. También existe la posibilidad de que aquellas bandas que aparentemente se encontraban contaminadas al cortarlas se trataba de dos bandas muy juntas, o era una banda donde migraron dos fлотipos distintos.

Las bandas diferentes fueron cortadas y enviadas a secuenciar. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en GenBank. Al realizar el BLAST, las 27 bandas tuvieron similitud filogenética con 12 especies cultivables. De acuerdo al porcentaje de cobertura e identidad son las especies filogenéticamente más

cercanas a las bandas obtenidas. Se mencionan como especies cercanas debido a que el porcentaje de identidad no fue lo suficientemente alto (mayor o igual al 99%), por lo que no se puede considerar en principio que se trate de la misma especie (Tabla 7). Esto probablemente debido a la baja calidad de las secuencias obtenidas, por lo que no se contaba con la secuencia consenso de las mismas.

Tabla 6. BLAST. Similitud de las secuencias obtenidas con sus parientes filogenéticamente más cercanos

# Secuencia	Especie filogenéticamente más cercana	% Cobertura	% Similitud	# Acceso a GenBank
1	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	89	87	NR_075007.1
2	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	86	90	NR_075007.1
3	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	87	86	NR_074940.1
4	<i>Geobacter daltonii strain</i>	89	88	NR_074916.1
5	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	88	88	NR_075007.1
6	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	87	89	NR_102776.1
7	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	68	91	NR_075007.1
8	<i>Saccharophagus degradans</i>	99	87	NR_074359.1
9	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>	89	86	NR_074692.1
10	<i>Rhodanobacter denitrificans</i>	91	93	NR_102497.1
11	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>	99	91	NR_074692.1
12	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>	88	88	NR_074692.1
13	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i>	80	86	NR_044901.1
14	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i>	87	91	NR_044901.1
15	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	89	87	NR_075007.1
16	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	94	79	NR_075002.1
17	S.S			
18	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>	69	85	NR_074692.1
19	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	89	87	NR_075007.1
20	<i>Geobacter uraniireducens</i>	89	88	NR_074940.1
21	<i>Saccharophagus degradans</i>	96	95	NR_074359.1
22	<i>Saccharophagus degradans</i>	92	90	NR_074359.1
23	<i>Geobacter metallireducens</i>	88	93	NR_075011.1
24	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	89	87	NR_075007.1
25	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>	91	90	NR_074692.1
26	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	86	88	NR_121678.1
27	<i>Planococcus halocryophilus</i>	98	85	NR_118149.1

Estas especies se distribuyeron de manera homogénea a lo largo de la laguna (Tabla 7), exceptuando la estación 6 de noviembre.

Tabla 7. Distribución de especies en el sedimento de la laguna de La Mancha, Veracruz.

Especie	nov-13							jun-14						
	Estaciones													
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccarophagus degradans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ectothiorhodospira mobilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodanobacter denitricans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacter bemidjensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Geobacter daltoni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Geobacter uraniireduces</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacter metallireducens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Planococcus halocryphilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

2.- Taxonomía y clasificación

Se obtuvieron un total de 12 especies pertenecientes a 9 géneros diferentes, incluidos en 8 familias, 6 órdenes, 3 clases y 2 phylum (Lista 1). Cabe mencionar que no se encontró similitud de la secuencia 17 (3.7%) con ninguna secuencia conocida o depositada en el GenBank. Esto probablemente debido a la mala calidad de la secuencia.

León-Galván *et al.*, (2009) encontraron en la laguna de Nichupte-Bojorquez que aproximadamente dos tercios de las bacterias identificadas en su estudio corresponden al filo Bacteroidetes. Hasta donde sabemos, los miembros del filo

Bacteroidetes son en su mayoría anaerobios estrictos y es indicado como el grupo taxonómico más abundante en las aguas oceánicas y costeras abiertas (Kirchman, 2002). Sin embargo, en este estudio no se encontró ninguna especie perteneciente a este grupo. La mayoría de las especies encontradas pertenecen al filo de las Proteobacterias, con excepción de la especie *Planococcus halocryophilus*, la cual pertenece al filo Firmicutes.

El filo de las Proteobacterias es muy diverso, presenta grupos con casi todos los tipos de metabolismos, ya que contiene especies autótrofas, heterótrofas, aerobias, anaerobias quimiolitótrofas, quimiorganótrofas, mixótrofas, etc. Es por eso que el estudio de su actividad metabólica resulta complicada, incluso en niveles taxonómicos como orden o familia (Rodríguez, 2016).

Lista 1. Distribución de especies encontradas en el sedimento de la laguna de La Mancha, Veracruz.

Phyllum: Proteobacteria

Clase: γ -Proteobacteria

Orden: Cellvibrionales

Familia: Cellvibrionaceae

Género: *Saccharophagus*

Especie: *S. degradans*

Phyllum: Proteobacteria

Clase: γ -Proteobacteria

Orden: Chormatiales

Familia: Ectothiorhodospiraceae

Géneros: *Thioalkalivibrio*

Ectothiorhodospira

Especies: *T. sulfidiphilus*

E. mobilis

Phyllum: Proteobacteria

Clase: γ -Proteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Rhodanobacteraceae

Género: *Rhodanobacter*

Especie: *R. denitrificans*

Phyllum: Proteobacteria

Clase: δ -Proteobacteria

Orden: Desulfuromonadales

Familia: Geobacteraceae

Género: *Geobacter*

Especies: *G. bemidjiensis*

G. daltonii

G. uraniireducens

G. metallireducens

Familia: Desulfuromonadaceae

Género: *Desulfuromonas*

Especie: *D. acetoxidans*

Phyllum: Proteobacteria

Clase: δ -Proteobacteria

Orden: Syntrophobacterales

Familia: Syntrophobacteraceae

Género: *Syntrophobacter*

Especie: *S. fumaroxidans*

Familia: *Syntrophaceae*

Género: *Syntrophus*

Especie: *S. aciditrophicus*

Phyllum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Planococcaceae

Género: *Planococcus*

Especie: *P. halocryphilus*

Moraga *et al.*, (2014) realizaron estudios en los que se analizó la composición bacteriana en sedimentos en la bahía de Mejillones (Chile), y determinaron que el grupo Proteobacteria fue el segundo grupo dominante, aunque cuantificaron un número relativamente bajo de las subclases α , β y γ . En dicha bahía las bacterias predominantes fueron las desnitrificantes.

En el presente trabajo, a nivel de clase, las δ -Proteobacterias representaron el grupo dominante, seguido de las γ -Proteobacterias y, por último, la clase Bacilli con sólo un representante.

La clase γ -Proteobacteria es la más rica en géneros (~250) de todos los phyla bacterianos con excepción de la clase Firmicutes. Los miembros exhiben amplios intervalos de trofismo, incluyendo quimioautotrofismo y fotoautotrofismo, así como de adaptación a diferentes temperaturas (Scott *et al.*, 2006). Esta clase contiene una mezcla fenotípicamente distinta de aerobios y anaerobios. Los representantes aerobios son bacterias deslizantes con un ciclo de vida complejo o bacterias depredadoras que atacan a otras bacterias Gram-negativas. El grupo anaeróbico está formado principalmente por respiradores que utilizan sulfuro, sulfato y/o metales, particularmente hierro y manganeso, como aceptores de electrones terminales. Existe un pequeño número de fermentadores pertenecientes a este grupo también. Los anaerobios pertenecientes a δ -Proteobacteria habitan en sedimentos marinos, dulceacuícolas y ambientes subsuperficiales (Green, 2014).

Dentro de estas clases, se encontraron microorganismos que pertenecen a seis órdenes distintos: Cellvibrionales, Chromatiales y Xanthomonadales se encuentran dentro de la clase de las γ -Proteobacterias, Desulfuromonadales y Syntrophobacterales dentro de la clase δ -Proteobacteria, y el orden Bacillales en la clase Bacilli. Predominó el orden Desulfuromonadales, seguido de Chromatiales, Cellvibrionales, Bacillales, Syntrophobacterales y Xanthomonadales.

El orden Cellvibrionales es aerobio, con un metabolismo respiratorio, además de ser mesofílico y quimiorganótrofo. La mayoría de sus cepas son positivas en la prueba de oxidasa (Parte *et al.*, 2014).

El orden Chromatiales, contiene bacterias fototróficas anoxigénicas conocidas como bacterias púrpuras del azufre, capaces de realizar fotosíntesis bajo condiciones anóxicas sin usar agua como agente reductor (así que no producen oxígeno) sino H₂S (Imhoff, 2005). En lo que respecta al orden Xanthomonadales, sus integrantes son aerobios obligados, con un tipo de metabolismo estrictamente respiratorio (Staley *et al.*, 1990).

Desulfuromonadales es un orden bacteriano en el que todos los miembros son estrictamente anaerobios, capaces de oxidar completamente los compuestos orgánicos usando azufre y/o metales como aceptores de electrones (entre ellos, azufre, Mn (IV), Fe (III), nitrato, Co (III), Tc (VII), U (VI) y ácido tricloroacético). Dicho orden incluye algunas de las bacterias reductoras de azufre y metal disimiladoras más importantes de los sedimentos marinos, dulceacuícolas o salobres (Staley *et al.*, 1990; Green, 2014). Actualmente, el orden Desulfuromonadales contiene dos familias estrechamente relacionadas: Desulfuromonadaceae y Geobacteraceae. Las especies *Desulfuromonas acetoxidans* y *Geobacter metallireducens* pertenecientes a este orden fueron las primeras bacterias desasimilatorias reductoras de sulfatos (SO₄⁻²) y reductoras de hierro, respectivamente, descubiertas. Desde su descubrimiento, el azufre y la reducción de hierro han sido encontrados como rasgos generalizados a través de los dominios procariotas (Green, 2014).

El orden Syntrophobacterales abarca quimiorganótrofos o quimiolitautótrofos anaerobios obligados. Algunos miembros utilizan sulfato como aceptor de electrones el cual es reducido a sulfuro; mientras que diversas especies en lugar de usar sulfato como aceptor de electrones reducen protones o forman formato, por lo cual requieren la presencia de organismos capaces de utilizar H₂ como organismos sintróficos (metanógenos o reductores de sulfato). Se han encontrado en ambientes acuáticos anóxicos, incluyendo hábitats de agua marina y dulce, así como en aguas residuales de plantas de tratamiento (Kuever *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que en este sistema se obtuvo una cantidad de CO similar a la de otros sistemas como el de Chantuto-Panzacola (Calva Benitez, 2006), pero relativamente alto con respecto a otros sistemas como El Llano, con un promedio de 1.70% de CO (Botello *et al.*, 2001). por ello no es sorprendente encontrar varias bacterias capaces de oxidar compuestos orgánicos, dado que el sistema es rico en materia orgánica, sobretodo en el área cercana a los ríos (E1-5).

Los microorganismos representados pertenecerían a ocho familias incluídas en los órdenes que se acaban de mencionar. La familia Cellvibrionaceae se encuentra en el orden Cellvibrionales, Ectothiorhodospiraceae dentro de Syntrophobacterales, en el orden Xanthomonadales está Rhodanobacteraceae. Dentro de Desulfuromonadales se incluyen las familias Geobacteraceae y Desulfuromonadaceae, dentro del orden Syntrophobacterales se encuentran las familias Syntrophobacteraceae y Syntrophaceae, y por último, Planococcaceae que está en el orden Bacillales.

Cellvibrionaceae incluye, principalmente, bacterias aisladas del suelo, ambientes marinos o de invertebrados. La capacidad de utilizar polisacáridos complejos como sustratos es un rasgo generalizado entre las cepas pertenecientes a esta familia (Parte *et al.*, 2014).

La familia Ectothiorhodospiraceae comprende bacterias que realizan una fotosíntesis anoxigénica utilizando bacterioclorofilas y carotenoides como pigmentos fotosintéticos. Oxidan el sulfuro a S⁰, que se deposita fuera de las células, y eventualmente pueden formar sulfato como producto de oxidación final. Se encuentran desde ambientes marinos hasta ambientes extremadamente salinos que contienen sulfuro y que tienen un pH alcalino. Las especies de esta familia son las eubacterias más halófilas (Imhoff, 2005).

Los organismos de Rhodanobacteraceae, al igual que Cellvibrionaceae, son aeróbios, quimioorganotróficos y no formadores de esporas. Los organismos dentro de esta familia pueden dar una reacción positiva o negativa tanto a la oxidasa como a la catalasa (Naushad *et al.*, 2015).

Todos los miembros de la familia Geobacteraceae son gram-negativos, mesófilos y quimioorganotróficos. Sus especies son capaces de reducir Fe (III) y utilizan principalmente ácidos orgánicos pequeños y alcoholes, además de contener genes para la fijación de nitrógeno (Holmes *et al.*, 2004).

La familia Desulfuromonadaceae está estrechamente relacionada con la familia Geobacteraceae, por lo que comparten muchas similitudes (Pfennig & Biebl, 1976). Los miembros de la familia Desulfuromonadaceae aunque son estrictamente anaerobios, se han reportado en algunos casos cierta tolerancia al oxígeno. Tienen un papel importante en la degradación de la materia orgánica y están involucrados en asociaciones sintróficas, especialmente con otros respiradores anaerobios, como bacterias fermentativas, metanógenos y bacterias fototróficas de azufre verde. La mayoría de las especies de la familia son mesófilas, pero hay varias especies psicrófilas, alcalofílicas/alcalinitolerantes y una termófila (Green, 2014).

Aunque parece no haber características fisiológicas únicas que distingan la familia Geobacteraceae de Desulfuromonadaceae, los miembros de la primera sólo han sido aislados de ambientes anóxicos de agua dulce, mientras que los integrantes de Desulfuromonadaceae están asociados principalmente con ambientes marinos (Garrity *et al.*, 2005, Kuever *et al.*, 2005).

Los miembros de la familia Syntrophobacteraceae son estrictamente anaerobios, con un tipo de metabolismo respiratorio o fermentativo. Podría, de hecho, ocurrir asociación sintrófica con organismos que utilizan H₂/formiato. Son bacterias de sulfato mesofílicas o moderadamente termófila, que se encuentran principalmente en agua dulce, lodos de depuradora o hábitats marinos. La mayoría de las especies descritas son quimioorganoheterótrofas; algunos son quimiolitoheterotróficas o quimiolitoheterotróficas. La mayoría de los miembros realizan una oxidación completa de los sustratos orgánicos, excepto un miembro del género *Syntrophobacter*, que muestra una oxidación incompleta del acetato (Kuever, 2014).

La familia Planococcaceae está formada por microorganismos en su mayoría gram positivos. Son aerobios y anaerobios facultativos, y producen una gran variedad de ácidos a partir de carbohidratos. Los valores de G + C del ADN para la familia Planococcaceae oscilan entre 34 y 54%. Filogenéticamente es un miembro del grupo Firmicutes y está estrechamente relacionado con Bacillaceae (Shivaji *et al.*, 2014).

Atendiendo a categorías taxonómicas inferiores, en el sedimento de la laguna de La Mancha se encontraron en los meses analizados 12 especies, pertenecientes a nueve géneros: *Sacharophagus degradans*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *Ectohiorhodospira mobilis*, *Rhodanobacter denitrificans*, *Geobacter bemidjiensis*, *Geobacter daltonii*, *Geobacter uraniireduces*, *Geobacter metalliredicens*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophus aciditrophicus* y *Planococcus halocryophilus*. Su distribución se presenta en la Lista 1.

El género *Saccharophagus* es el mayor degradador de carbohidratos marinos conocido en la actualidad, y requiere de sales marinas para su crecimiento. Participa en los ciclos de carbono oceánicos y estuarinos, es Gram-negativo, heterotrófico, pleomórfico, aerobio, positivo a la catalasa y a la oxidasa (Ekborg *et al.*, 2005).

Saccharophagus degradans es la primera bacteria marina de vida libre que se ha demostrado que escapaz de degradar algas celulósicas y material vegetal superior. Tiene una capacidad de degradar al menos diez diferentes polisacáridos complejos. Estas capacidades enzimáticas inicialmente sugirieron que tiene un papel significativo en el ciclo del carbono marino, funcionando como un "super-degradador" y mediando la descomposición de polisacáridos complejos de plantas, algas e invertebrados (Ensor *et al.*, 1999). Normalmente se requieren consorcios de microorganismos para degradar carbohidratos complejos (celulosa) y tales microorganismos suelen ser especialistas en la degradación de uno o varios carbohidratos diferentes. Por esa razón, *S. degradans* es único e inusual, por su capacidad para mineralizar completamente una planta en cultivo puro, en aguas marinas. Además, hay que tener en cuenta sus capacidades adicionales para

degradar los polímeros estructurales de algas (agar y alginato), así como el polisacárido quitina, característico de los invertebrados (Weiner *et al.*, 2008).

Thioalkalivibrio es un género de quimiolitautótrofos obligados, halotolerantes. Oxidan el sulfuro, el tiosulfato, azufre y tetrionato, por lo que asimilan el carbono a través del ciclo de Calvin. Este género contiene haloalcalifílicos obligados y forma un grupo monofilético (pese a la relativamente grande divergencia filogenética de su subgrupo principal) dentro de la familia *Ectothiorhodospiraceae*, que se sabe que alberga especies halófilas y haloalcalifílicas (Imhoff, 2005). Hasta la fecha, las bacterias quimiolitotróficas, haloalcalifílicas y sulfuroxidizantes (SOB) se han aislado sólo de los lagos de sosa que se encuentran en condiciones naturales en hábitats extremadamente alcalinos y salinos (Imhoff, 2005).

Thioalkalivibrio sulfidiphilus utiliza CO₂ como fuente de carbono y reduce compuestos de azufre inorgánico como fuente de energía. La característica principal de estos organismos, que los diferencia de otros SOB, es su capacidad de crecer óptimamente a pH 9.5-10.0. Sin embargo, parece que la especie se puede desarrollar en ambientes con un rango de pH mayor, incluso bastante más bajos (6.2-8.6) (Muyzer *et al.*, 2011).

Todas las especies de *Ectothiorhodospira* crecen bien bajo condiciones anóxicas a la luz, utilizando compuestos de azufre reducidos como donadores de electrones fotosintéticos en presencia de fuentes de carbono orgánico e inorgánicos. El SO se deposita fuera de las células como producto intermedio (Staley *et al.*, 1990).

Como cualquier otra bacteria fototrófica, las especies de *Ectothiorhodospira* se encuentran en todo tipo de ambientes acuáticos, pero sobretodo en litoral estancado, estuarios y ambientes con alta salinidad. *Ectothiorhodospira mobilis* crece en condiciones anaerobias. Los sulfuros solubles originados de la sulfato reducción de las bacterias son sus sustratos preferidos. Su pH óptimo es entre 7.4 y 8.1, y su crecimiento es mejor entre los 25 y 48°C, así como en una salinidad de entre 0 y 30% (Trüper & Imhoff, 1981). Acetato, piruvato, malato, succinato, y fumarato son utilizados como fuente de carbono orgánico y donadores de electrones (Staley *et al.*, 1990).

El género *Rhodanobacter* es aerobio estricto, quimioorganotrófico y su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C (Imhoff, 2005). En cuanto a *Rhodanobacter denitrificans*, su metabolismo anaerobio no ha sido estudiado en detalle, ya que ninguna de las especies reconocidas para el género *Rhodanobacter* ha demostrado ser capaz de realizar una desnitrificación completa. Estudios moleculares cuantitativos y semicuantitativos de ambientes subsuperficiales ricos en nitratos han revelado abundancias y actividad extremadamente altas de las bacterias del género *Rhodanobacter* (Green *et al.*, 2010).

Green *et al.* (2012) demostraron que el pH es un impulsor principal de la estructura de la comunidad microbiana subterránea y de las bacterias desnitrificantes, y que las bacterias del género *Rhodanobacter* dominan a pH bajo. En este caso, el pH registrado en la E6-nov fue de 7.1, además de que el mes de noviembre fue el que obtuvo el menor pH registrado (7.13).

Existe cierta dominancia de microorganismos del género *Geobacter*, seguido de *Thioalkalivibrio*. El género *Geobacter* se encontró en todas estaciones de muestreo, sus cepas son a menudo los miembros dominantes de los sedimentos subsuperficiales en condiciones de reducción de metal (Lovley *et al.*, 2004). Las especies de *Geobacter* son generalmente los microorganismos predominantes en muchos suelos y sedimentos en los que la reducción de Fe (III) es un proceso importante (Rotaru *et al.*, 2011), tanto para la degradación de la materia orgánica natural como de contaminantes orgánicos o para estimular la biorremediación *in situ* de entornos subterráneos contaminados con metales (Lovley *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2007).

La reducción disimilatoria del Fe (III) es un proceso acoplado a la descomposición terminal de materia orgánica en los sedimentos acuáticos y marinos (Kostka *et al.*, 2002; Canfield *et al.*, 2005), que también puede afectar a los ciclos biogeoquímicos globales controlando la liberación de fosfato inorgánico secuestrado en minerales de óxido de Fe (III) y suprimiendo la producción de metano. En ambientes subsuperficiales, se ha demostrado que los microorganismos reductores de Fe (III) pueden degradar o eliminar las sustancias orgánicas y contaminantes inorgánicos,

por lo que desempeñan un papel importante en las estrategias de remediación para la protección de las aguas subterráneas (Lovley, 2006).

Los estudios fisiológicos con especies de *Geobacter* revelan una serie de propiedades microbianas novedosas que tienen un impacto en la geoquímica de algunos suelos anaeróbicos y sedimentos, y en algunos casos tienen aplicaciones prácticas (Rotaru *et al.*, 2011). Estas especies representan un ejemplo raro de microorganismos que son abundantes por su papel biogeoquímico en los ciclos del carbono y de los metales, lo cual permite que las especies de este género llenen nichos importantes en una gran diversidad de ambientes anaerobios.

Existen estudios (Botello *et al.*, 2001) en los que se ha demostrado que la laguna de La Mancha se encuentra contaminada con desechos orgánicos y metálicos, por lo que la presencia de bacterias degradadoras como *Geobacter bemidjensis* es de esperarse, ya que además crece a una temperatura ideal de 30°C (Aklujkar *et al.*, 2010).

G. daltonii también es capaz de utilizar el oxihidróxido de Fe (III) como aceptor de electrones, utilizando acetato como donante de electrones y sustrato de carbono. Su crecimiento se produce a 20-35°C, siendo su óptimo a 30°C, este se produce en ausencia de NaCl, aunque puede tolerar hasta 0.7% de NaCl. Su crecimiento ocurre a un pH de 6.0-8.0. Utiliza citrato férrico, azufre elemental, malato y fumarato como aceptores de electrones, pero el nitrato no se reduce (Prakash *et al.*, 2010).

Geobacter metallireducens, al igual que *G. bemidjensis*, es miembro de la familia Geobacteraceae, y su papel en la biorremediación de aguas subterráneas contaminadas con materiales orgánicos y metálicos, así como la recolección de electricidad a partir de materia orgánica compleja es importante (Lovley *et al.*, 2004). Sin embargo, *G. metallireducens* contiene más genes para el metabolismo de ácidos orgánicos, incluyendo acetato, propionato y piruvato, mientras que *G. uraniireducens* utiliza Fe (III) como donador de electrones y crece bien a un pH 6.0-7.7 (Prakash *et al.*, 2010).

La constatación de que las especies de *Geobacter* son importantes microorganismos sintróficos, formando alianzas con microorganismos metanogénicos en condiciones en las que pueden contribuir significativamente a la conversión de residuos orgánicos o depósitos de hidrocarburos a metano ha constituido una sorpresa (Rotaru *et al.*, 2011).

El género *Desulfuromonas* realiza respiración anaerobia utilizando azufre elemental. Estas bacterias acoplan la oxidación de substratos tales como acetato y etanol a la reducción del azufre elemental a sulfuro de hidrógeno (Ortíz-Maya *et al.*, 2017).

Se ha determinado que *Desulfuromonas acetoxidans* puede oxidar el azufre elemental a sulfito y sulfato, además de causar la reducción de S⁰ con la generación de H₂S (Zhang *et al.*, 2014). Cabe mencionar que esta especie se localizó sólo en la estación 3 en el mes de junio de 2014, por lo que su distribución en el sistema no es homogénea.

El género *Syntrophobacter* es un quimiorganótrofo estricto mesofílico. Crece a un pH neutro (6.2-8) en salinidades bajas, además de realizar reducción de sulfato. Tiene un metabolismo sintrófico del tipo fermentativo, por lo que requiere la presencia de organismos que utilizan hidrógeno u organismos que utilicen fumarato (metanogénicas o sulfato reductoras) o sulfato como aceptores de electrones. Muchas de las especies de *Syntrophobacter* son capaces de utilizar sulfato como aceptor de electrones para la oxidación de propionato y algunos otros compuestos orgánicos e hidrógeno (McInerney *et al.*, 2008, Plugge *et al.*, 2011). Además, pueden crecer por fermentación de piruvato y fumarato. Sin embargo, oxida de manera incompleta el substrato orgánico a acetato (Staley *et al.*, 1990). Todas las bacterias oxidantes propiónicas sintróficas identificadas en la actualidad están afiliadas bien con la clase δ -Proteobacteria, a la que pertenece *Syntrophobacter*, o a la clase Clostridia dentro del phylum Firmicutes (McInerney *et al.*, 2008).

S. fumaroxidans tiene metabolismo estrictamente anaeróbico y puede ser respiratorio o fermentativo (McInerney *et al.*, 2008). El intervalo de temperatura para el crecimiento es de 20-40°C (óptimo a 37°C) (Plugge *et al.*, 2012). Todas las especies de *Syntrophobacter* oxidan propionato a acetato e hidrógeno cuando se encuentran

en la presencia de un organismo que utiliza fumarato e hidrógeno, así como microorganismos metanogénicos o sulfato reductores. Por el contrario, *S. fumaroxidans* es incapaz de degradar propionato en presencia de un metanógeno que utiliza sólo hidrógeno, sugiriendo que el uso de fumarato e hidrógeno es requerido para su metabolismo sintrófico del propionato (Boone *et al.*, 2001).

Los miembros del género *Syntrophus* son incapaces de utilizar sulfato como aceptor de electrones, por lo que crecen en asociación sintrófica con microorganismos que utilizan H₂ y oxidan sustratos incompletamente a acetato. Todos los miembros del género son bacterias mesofílicas, y la mayoría de las especies son fermentativas (Staley *et al.*, 1990).

Syntrophus aciditrophicus es una bacteria Gram-negativa sintrófica degradadora de ácidos grasos, ácidos aromáticos, benzoato, carboxilato de ciclohexano, carboxilato de ciclohex-1-eno y crotonato, en cocultivo con metanógenos o reductores de sulfato que contienen hidrógeno/formiato. Filogenéticamente, *S. aciditrophicus* es un miembro de la subdivisión δ -Proteobacteria junto con reductores de sulfato y especies de *Geobacter*. Tienen un papel esencial en el reciclaje anaeróbico de materia orgánica a metano y dióxido de carbono, junto con los organismos fermentativos y metanogénicos (Elshahed *et al.*, 2001). Mientras que las vías de emisión de carbono y energía de estos dos últimos grupos microbianos se conocen bien, se conoce muy poco sobre el metabolismo de los síntróficos, porque hay pocas cepas disponibles en cultivo puro. Se reproducen lentamente (tiempos de generación de 24-50 h), con bajo rendimiento, y requieren socios simbióticos para sobrevivir y expresar su estilo de vida sintrófico. Bioquímicamente, constituyen el eslabón perdido en nuestra comprensión del flujo anaeróbico de carbono en la biosfera (McInerney *et al.*, 2007).

Todos los miembros del género *Planococcus* son gram-positivos, cocos aerobios capaces de crecer a temperaturas moderadamente bajas y altas concentraciones de sal; además, han sido aislados predominantemente de ambientes fríos y/o salinos (Mykytczuk *et al.*, 2012).

Planococcus halocryphilus crece entre -10 y 37°C (de forma óptima a 25°C). Es una especie halotolerante y crece en presencia de NaCl al 0-19%, pero la alta salinidad no es esencial para su crecimiento. El intervalo de pH de crecimiento es de 6,0-11,0, con un crecimiento óptimo a pH 7,0-8,0 (Mykytczuk *et al.*, 2012). Esta especie sólo fue localizada en la estación 7 en el mes de junio de 2014. Al estar tan cerca de la boca de la laguna y disfrutar de concentraciones más altas de salinidad, esta especie tendría allí todo lo necesario para crecer.

Las especies *Saccarophagus degradans*, *Geobacter uraniireduces*, *Rhodanobacter denitricans*, y *Geobacter metallireducens* se localizaron sólo en la estación 6 en el mes de noviembre de 2013. Cabe mencionar que en esta estación se encontraron 10 de las 12 especies descritas en este trabajo.

Las especies *Geobacter bemidjensis*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *Ectothiorhodospira mobilis*, *Geobacter daltonii* y *Syntrophobacter fumaroxidans* tuvieron una amplia distribución en este sistema, ya que se encontraron en todas las estaciones durante los dos meses de muestreo.

Debido a que múltiples especies pueden realizar roles funcionales similares (Hooper *et al.*, 2005), la diversidad observada en los sedimentos puede proveer estabilidad al ecosistema contra disturbios ambientales. La estructura de la comunidad bacteriana está generalmente regulada por la capacidad de las bacterias para poder hacer frente a varias condiciones ambientales, estos factores pueden incluir el tipo de suelo, el tipo de vegetación, salinidad, nutrientes, etc, siendo la salinidad el factor que se cree principal (Prieur *et al.*, 1987). Por otra parte, las perturbaciones ambientales, dependiendo de su intensidad y extensión pueden llevar a la disminución de la diversidad local, conduciendo a la proliferación de poblaciones adaptadas que pasan a ser dominantes (Torsvik *et al.* 2002).

Se esperaba un cambio en la composición bacteriana debido al gradiente de salinidad, pero al parecer existen otros factores que pueden llegar a ser más determinantes en la composición microbiana de una comunidad. Se sabe que los ambientes variables soportan una red más amplia de especies que entornos estables, en los que las especies mejor adaptadas con frecuencia superan a todas

las demás. Esto podría indicar que las afluencias de agua de mar u otros mecanismos de agitación son comunes en este complejo lagunar, proporcionando importantes mecanismos para el mantenimiento de la variedad de especies bacterianas que se observa (León-Galván *et al.*, 2009).

El hecho de que no se haya encontrado un marcado gradiente en cuanto a la composición microbiana se puede deber a múltiples factores. Benlloc *et al.* (2002), observaron cambios progresivos en los patrones de bandas de un estanque a salinidades superiores (>35 ups), pero este gradiente de salinidad era mucho más pronunciado al obtenido en el presente trabajo, ya que aquí en ningún momento se llegó a tener salinidades mayores a 35 ups (marinas), ni aguas completamente dulceacuícolas. En esta trabajo sí se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Ikenaga *et al.* (2010), quienes encontraron secuencias similares a bacterias reductoras de sulfatos en δ *Proteobacterias* y secuencias de bacterias fototróficas púrpuras del azufre en γ -*Proteobacterias*, respectivamente.

Una amplia gama de compuestos orgánicos incluyendo alcoholes, ácidos grasos, ácidos aromáticos, ácidos orgánicos (tales como lactato y glicolato), muchos aminoácidos, azúcares e hidrocarburos (incluyendo metano) se degradan sintróficamente bajo condiciones anaeróbicas (Kelso *et al.*, 1997). Por otro lado, existen pruebas de que la nitrificación se limita a la superficie del sedimento; por lo tanto, en ambientes más ricos en oxígeno se espera que las poblaciones bacterianas sean más eficientes y competitivas en el uso de la oferta de carbono que en condiciones anaeróbicas, tales como las desnitrificantes (Kelso *et al.*, 1997).

Filogenia

Características del gen

La matriz de datos comprendió un total de 43 secuencias y 363 caracteres, de los cuales 198 sitios fueron variables informativos para la parsimonia, 118 sitios conservados y 245 sitios variables.

Divergencia en las secuencias del gen 16S.

Un total de 43 secuencias fueron analizadas, incluyéndose muestras de 9 géneros: *Saccharophagus*, *Thioalkalivibrio*, *Ectothihordospira*, *Rhodanobacter*, *Geobacter*, *Desulfuromonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus* y *Planococcus*.

Los valores de divergencia intergenérica oscilaron entre 4.3 y 33% (Anexo 10). Los valores de distancia genética obtenidos entre las secuencias obtenidas en el presente trabajo oscilaron de 2.7 a 62% (Anexo 11). Estas secuencias divergieron entre 8 y 60% de la secuencia de *Saccharophagus degradans* NR07435 contenida en GenBank.

Análisis filogenéticos

Las topologías obtenidas en los análisis de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesiano fueron similares (Fig. 15). El análisis de parsimonia arrojó 100 arboles más parsimoniosos, con una longitud de 1786 pasos. El Índice de Consistencia (IC) obtenido fue de 0.25 y el Índice de Retención (IR) fue de 0.56.

La topología del análisis bayesiano (Fig. 16) confirmó que todas las muestras obtenidas en el presente estudio (27) se ubican en un clado monofilético, hermano al

clado que incluye la secuencia de *Saccharophagus degradans* NR074359 en GenBank.

Los valores de distancia genética registrados entre las 27 secuencias obtenidas son elevados, por lo que cada secuencia se corresponde con una entidad taxonómica independiente. A su vez, estas secuencias divergen con altos valores de la secuencia de *Saccharophagus degradans* en GenBank, por lo que no se puede establecer la identidad de las secuencias obtenidas en el presente trabajo.

Teniendo en cuenta los resultados de divergencia genética y análisis filogenéticos realizados, se propone la presencia de 27 entidades taxonómicas diferentes, correspondientes a cada secuencia obtenida en el presente estudio. Estas secuencias son filogenéticamente cercanas al género *Saccharophagus*.

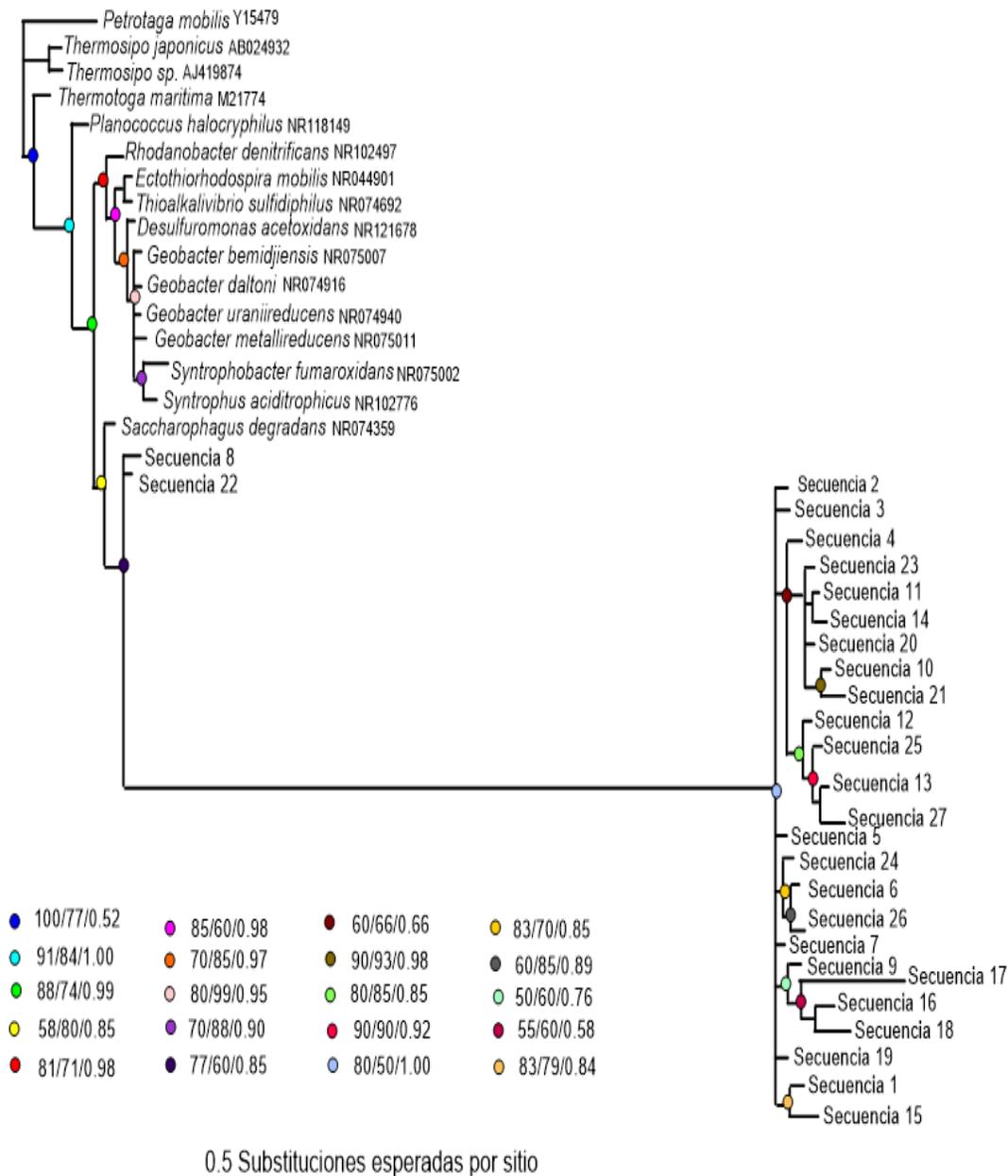


Figura 15. Reconstrucción filogenética Bayesiana. Los valores de soporte en las ramas indican de izquierda a derecha: Valores de Bootstrap Máxima Parsimonia / Valores de Bootstrap Máxima Verosimilitud / Valores de Probabilidad Posterior Bayesiana.

Importancia ecológica

Los procariotas muestran una impresionante variedad de procesos metabólicos. En el medio ambiente, estos complicados metabolismos bacterianos se encuentran relacionados y contribuyen a generar ecosistemas complejos que son protagonistas fundamentales de los ciclos biogeoquímicos (Moreno *et al.*, 2012).

Los procesos biológicos que se dan en un sistema dependen de la energía de las reacciones, favoreciéndose aquellos que obtienen mayor energía del sustrato. La fuente de energía para el mantenimiento celular puede ser química (quimiótrofos) o lumínica (fotótrofos). Los organismos fotótrofos convierten la energía lumínica en energía metabólica y poder reductor, pero en los sedimentos de la laguna de La Mancha predominaron los metabolismos basados en la quimiotrofia (quimio-organotrofia o quimio-litotrofia), esto debido a que los sedimentos fueron tomados de las capas anóxicas. A su vez, la fuente de carbono empleada puede ser inorgánica (autótrofos) u orgánica (heterótrofos) (Sánchez-Andrea, 2012).

Hay dos tipos de metabolismo quimiótrofo principales: la fermentación y la respiración. Existen diferentes fermentaciones: alcohólica, láctica, propiónica, ácido-mixta y de acetona-butanol, estas generan como productos distintos tipos de ácidos grasos volátiles, alcoholes e hidrógeno (Sánchez-Andrea, 2012). A pesar de que en el presente estudio no se realizó el análisis de los productos fermentativos, sabemos que en el ecosistema se encuentran especies de ese tipo, ya que se identificaron bacterias capaces de realizar fermentación como *Syntrophobacter fumaroxidans*. Aunque en este tipo de metabolismo, los compuestos orgánicos son degradados de forma incompleta.

Los productos de fermentación como el propionato y el butirato pueden ser oxidados a acetato, CO₂ y H₂. Esta oxidación es llevada a cabo por un grupo denominado “organismos acetógenos productores obligados de hidrógeno (OHPA)”, mediante un proceso conocido como acetogénesis. Aunque la energía de este proceso es muy baja, su acoplamiento con metanógenas consumidoras de hidrógeno (que reducen la presión parcial de hidrógeno) la convierte en favorable. Esta relación se denomina

sintrófica y la llevan a cabo bacterias del género *Syntrophobacter* (Sánchez-Andrea, 2012).

Dentro del sistema lagunar en estudio se encontraron dos especies aerobias, *S. degradans* y *Planococcus halocryphilus*, especies que se localizaron cerca de la boca de la laguna (posiblemente el principal factor para su identificación en dichas estaciones). La muestra de sedimento se localizó en la zona óxica, sin embargo existen numerosos ciclos dentro del ecosistema.

La respiración anaeróbica es un proceso en el que los sustratos orgánicos son completamente degradados a dióxido de carbono, pero requieren un compuesto distinto al oxígeno como aceptor terminal de electrones (Moreno *et al.*, 2012). Cuando la concentración de oxígeno se reduce por debajo de 2-8 μM , el nitrato se convierte en el mejor aceptor de electrones (Canfield *et al.*, 1992). Como se mencionó anteriormente la especie *R. denitrificans* se cree que es capaz de realizar una desnitrificación incompleta, sin embargo al no poder comprobarse aún, no se indentificó ninguna es especie de este tipo en la laguna.

Existe una amplia conexión entre las especies obtenidas, esto debido a los diferentes metabolismos que tienen. En la parte superficial del sedimento tenemos la respiración aerobia en la que encontramos especies como *S. degradans*, *P. halocryophilus* y *R. denitrificans*, esta comienza con polímeros como la glucosa, llevándola hasta CO_2 , agua y piruvato. La fotosíntesis anoxigénica se realiza en presencia de luz, aquí encontramos a *E. mobilis*, la cual utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono. En la siguiente capa del sedimento tenemos la fermentación; no se identificaron especies del tipo fermentativo, pero si especies que son sintróficas de las mismas, como *S. fumaroxidans*, *S. aciditrophicus* e incluso *G. metallireducens*, los cuales utilizan los desechos de las fermentadoras como donadores de electrones.

No se encontraron bacterias desnitrificantes en este estudio, sin embargo existe una alta probabilidad de que se encuentren el sistema.

D. acetoxidans es una representante de las BSR, en donde se liberan sulfitos o sulfatos, los cuales también pueden ser utilizados por otras especies, tal como *T. sulfidiphilus* la cual puede reducir compuestos inorgánicos de S⁰.

De acuerdo a lo anterior se propone el siguiente modelo conceptual (Figura 16).

Las bacterias reductoras del azufre (BSR) pueden utilizar los subproductos de la fermentación para su respiración anaerobia, usando sulfato u otras formas parcialmente oxidadas de azufre como el tiosulfato y generando grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno en el proceso. El sulfuro de hidrógeno producido reacciona con el hierro y otros metales precipitándolos en forma de sulfuros (Sánchez-Andrea, 2012). Por esa razón, allí es donde las BSR son más abundantes, se reduce la concentración de sulfato y aumenta el pH, como consecuencia de su metabolismo. En la laguna de La Mancha se encontró a la especie *D. acetoxidans*, como BSR, la cual es sintrófica de especies fermentativas.

El acetato e hidrógeno producido tras los procesos anteriores son substratos típicos de la metanogénesis. A pesar de que la metanogénesis no es el proceso dominante en la fase terminal de la mineralización anaeróbica en sedimentos costeros y marinos, se ha reportado la presencia de un número elevado de bacterias metanogénicas en éstos (Ramamurthy *et al.*, 1990). Es por esto que se infiere que aunque no se identificaron especies del tipo metanogénicas en el sistema, estas se encuentran en el mismo, ya que suelen encontrarse en sintrofia con especies del género *Geobacter*.

Una de las características de la actividad de las BSR en ambientes salinos es que gran parte del sulfuro de hidrógeno producido no llega a la atmósfera porque sigue alguno de estos tres caminos: se precipita como monosulfuro de hierro (lo cual se corresponde con los fangos negros untuosos), es re-oxidado en las aguas superficiales por las bacterias oxidadoras de sulfuros, o bien es utilizado como donador de protones por las bacterias fotótrofas anoxigénicas. *E. mobilis* realiza una fotosíntesis anoxigénica, por lo que podría tener una relación sintrófica con las BSR debido a que los sulfuros son sus sustratos preferidos.

Algunos autores mencionan que esta relación entre bacterias sulfato-reductoras y fotótrofas del azufre puede llegar a considerarse un mutualismo, debido a la estrecha complementación metabólica que existe entre ellas (Reese et al. 2008).

Por otra parte, la reducción de hierro ha sido descrita como una de las principales formas de degradación de materia orgánica en sedimentos y los organismos que la llevan a cabo han sido utilizados en biorremediación y producción de energía (Sánchez-Andrea, 2012).

La cantidad similar de microorganismos heterótrofos encontrados sugiere la presencia de compuestos orgánicos biodisponibles en todos los sectores de la laguna. El origen de estos compuestos podría ser diferente según los sectores analizados, pues muchos de ellos podrían provenir de ríos y de la zona de asentamientos urbanos. En los sitios cercanos a la desembocadura del río podrían ser incluso de origen alóctono.

El papel ecológico de los procariotas, que reducen el exceso de carga orgánica y producen biomasa que puede ser utilizada por los consumidores, representa un ejemplo de mecanismos de retroalimentación que permiten a los sistemas de la laguna evitar el colapso de su funcionamiento (Danovaro & Pusceddu, 2007).

Por lo que en la laguna se logra apreciar un grado de sintrofia entre numerosas especies debido a los productos de desecho de algunas especies son incorporadas por otras creando una armonía en el sistema.

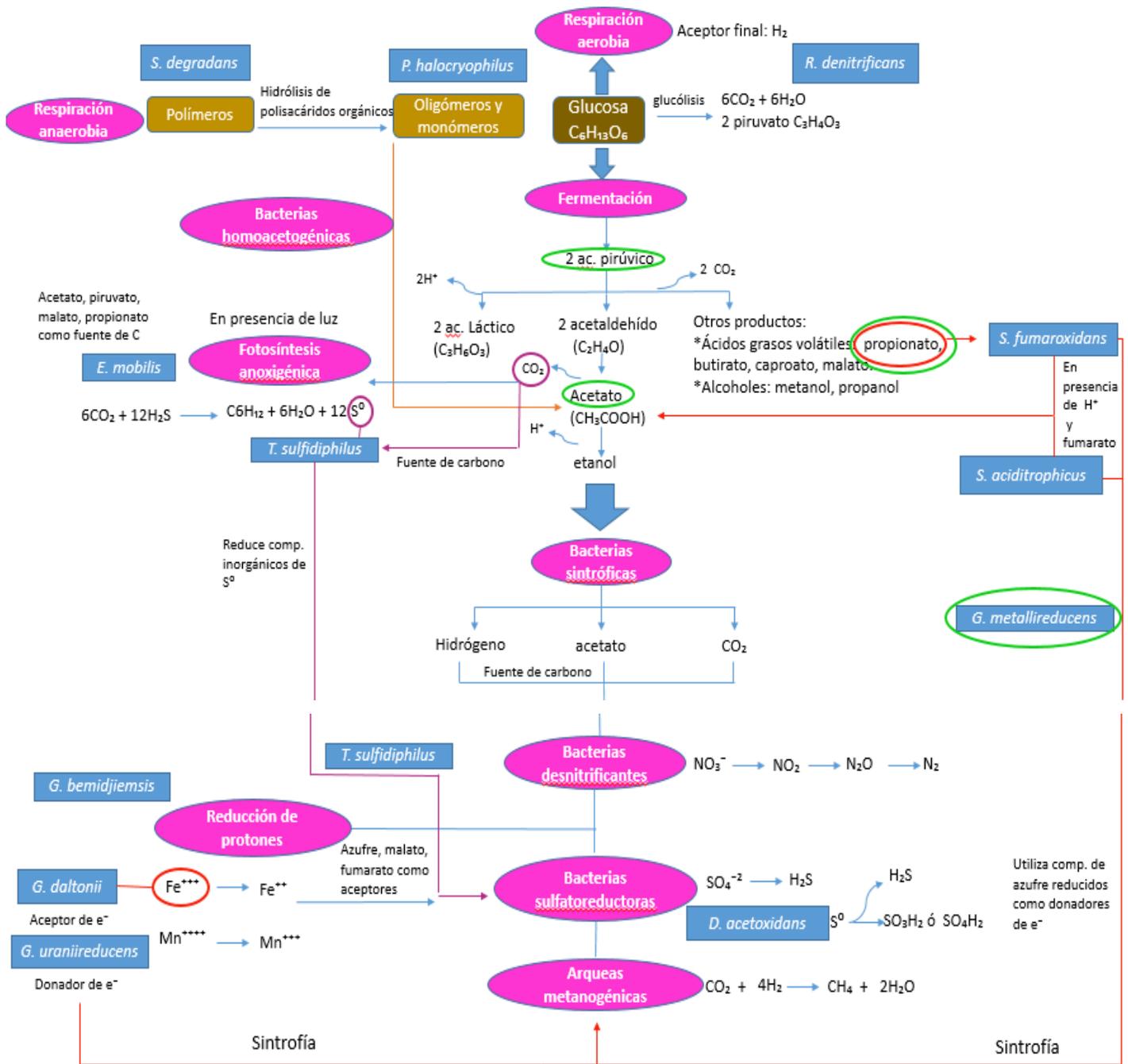


Figura 16. Esquema de las asociaciones sintróficas entre especies encontradas en la laguna de La Mancha, Veracruz.

CONCLUSIONES

- La textura de los sedimentos entre las estaciones analizadas no presentó diferencias significativas entre los principales tipos de grano: arenas y limos, exceptuando en arcillas, pero la textura dominante en todo momento fue arena fina, esto debido probablemente a la hidrodinámica del sistema.
- Los parámetros fisicoquímicos de salinidad, pH y OD no tuvieron diferencias significativas entre estaciones, sin embargo se observa un gradiente positivo hacia la boca de la laguna.
- El CO fue el único parámetro fisicoquímico que sí tuvo diferencias significativas entre estaciones, en este se observa un gradiente inverso de la zona de manglar hacia la boca de la laguna. Los carbohidratos también presentan una relación inversa hacia la zona marina.
- A pesar de que los sedimentos presentan un gradiente de salinidad y MO, la diversidad bacteriana en estos sedimentos no presentó cambios como resultado de dicho gradiente.
- Los parámetros fisicoquímicos no tuvieron relación con la composición microbiana en los sedimentos de la laguna.
- La técnica de DGGE, probablemente necesite de un mayor gradiente de urea, esto con la finalidad de que las bandas obtenidas en la parte superior del gel puedan separarse aún más, permitiendo así una mejor visualización de las mismas, evitando así que se traslapen, y por lo tanto exista un posible mayor número de bandas, lo que conlleva a una mayor composición microbiana en la laguna.

- La técnica de DGGE permitió observar la homogeneidad en cuanto a diversidad microbiana debido al patrón de bandas similar en cada estación de muestreo, con la excepción de la estación 6 en la que la diversidad fue mayor que en las demás estaciones
- Se dilucidaron 27 bandas en el DGGE, las cuales corresponden a 27 entidades diferentes.
- El análisis de Blast arrojó 12 entidades en la laguna de La Mancha, las cuales son filogenéticamente cercanas a: *Sacharophagus degradans*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *Ectohiorhodospira mobilis*, *Rhodanobacter denitrificans*, *Geobacter bemidjiensis*, *Geobacter daltonii*, *Geobacter uraniireduces*, *Geobacter metalliredicens*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophus aciditrophicus* y *Planococcus halocryophilus*.
- Los análisis filogenéticos y de distancia genética realizados proponen la presencia de 27 entidades taxonómicas diferentes, correspondientes a cada secuencia obtenida en el presente estudio.
- Las secuencias obtenidas en el presente estudio se ubicaron filogenéticamente cercanas al género *Saccharophagus*.
- Se infieren múltiples metabolismos que incluyen: fermentación, sulfatorreducción, desnitrificación, reducción de protones y metanogénesis, lo que evidencia el amplio rango de tolerancia de los microorganismos a las condiciones ambientales.

- Las especies encontradas son de importancia para el reciclaje de nutrientes en el ecosistema. Algunas de ellas son sintróficas, por lo que generan un equilibrio en sistema, en el que nada se desperdicia, regulando así los ciclos biogeoquímicos en los que participan.
- Dado que muchas especies son capaces de la degradación de compuestos, pueden ser utilizadas en la bioremediación y su investigación para nuevos usos en diferentes áreas de la industria.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente estudio representa una contribución al conocimiento de la composición microbiana en los sedimentos de la laguna costera de La Mancha, Veracruz, siendo éste el primer estudio de dicha laguna en el que se consideran los parámetros fisicoquímicos, granulométricos, biogeoquímicos y filogenéticos de los microorganismos. A partir de los resultados derivados de este trabajo se plantean nuevas propuestas de investigación:

- Es necesaria la investigación de métodos con los cuales se pueda lograr la amplificación mediante PCR de las muestras obtenidas durante el mes de julio del 2013.
- La implementación de metagenómica ayudaría a la posibilidad de secuenciar directamente los genomas de los microorganismos, abriendo así nuevas puertas a la microbiología.
- Estudiar la biodiversidad de arqueas metanogénicas en el ecosistema para poder ampliar la diversidad obtenida. Esto podría contribuir al modelo conceptual propuesto.
- Las técnicas moleculares de clonación podrían ser utilizadas con el fin de mejorar la calidad de las secuencias.
- La utilización de otros primers de diferente genes funcionales, combinándolos así poder tener una perspectiva mucho más amplia de los metabolismos realizados en el ecosistema.
- Un análisis combinado con diferentes genes para una filogenia más robusta.

BIBLIOGRAFÍA

Achenbach-Richter, L., Gupta, R., Stetter, K. O., & Woese, C. R. (1987). Were the original eubacteria thermophiles?. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(1), 34-39.

Aklujkar, M., Krushkal, J., DiBartolo, G., Lapidus, A., Land, M. L., & Lovley, D. R. (2009). The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiology*, 9(1), 109.

Aklujkar, M., Young, N. D., Holmes, D., Chavan, M., Risso, C., Kiss, H. E., ...& Lovley, D. R. (2010). The genome of *Geobacter bemidjensis*, exemplar for the subsurface clade of *Geobacter* species that predominate in Fe (III)-reducing subsurface environments. *BMC Genomics*, 11(1), 490.

Al-Ghadban, A. N., Jacob, P. G., & Abdali, F. (1994). Total organic carbon in the sediments of the Arabian Gulf and need for biological productivity investigations. *Marine Pollution Bulletin*, 28(6), 356-362.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

Araya, R., Leiva, J. C., & Valdés, J. (2008). Caracterización molecular de las comunidades bacterianas asociadas a sedimentos de un sistema costero del norte de la corriente de Humboldt, bahía de Mejillones del Sur, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3), 547-557.

Atlas, R. M., & Bartha, R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. En: *Advances in Microbial Ecology* (pp. 287-338). Springer US.

Ayala-Pérez, L. A., Ramos-Miranda, J., & Flores-Hernández, D. (2003). La comunidad de peces de la Laguna de Términos: estructura actual comparada. *Revista de Biología Tropical* 51(3-4), 783-793.

Barbier, E. B., Hacker, S. D., Kennedy, C., Koch, E. W., Stier, A. C., & Silliman, B. R. (2011). The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81(2), 169-193.

Baker, B. J., Lazar, C. S., Teske, A. P., & Dick, G. J. (2015). Genomic resolution of linkages in carbon, nitrogen, and sulfur cycling among widespread estuary sediment bacteria. *Microbiome*, 3(1), 14.

Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-Alió, C., & Rodríguez-Valera F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 349-360.

Ben Said, O., Goñi-Urriza, M., El Bour, M., Aissa, P., & Duran, R. (2010). Bacterial community structure of sediments of the Bizerte lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean coastal anthropized lagoon. *Microbial Ecology*, 59, 445-456.

Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*/George M. Garrity, editor-in-chief. 2nd ed.

Boone, D. R., Goodfellow, M., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Vos, P. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Bergey's Manual Trust.

Borsheim, K. Y., Mykkestad, S. M., & Snelli, J. A. (1999). Monthly profiles of DOC, mono- and polysaccharides at two locations in the Trondheimsfjord (Norway) during two years. *Marine Chemistry* 63(18), 255-272.

Botello, A. V. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from coastal lagoons of Veracruz State, Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(6), 889-897.

Bouvier, T. C., & del Giorgio, P. A. (2002) Compositional changes in free-living bacteria communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography* 47, 453-470.

Cabello, P., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*, 150(11), 3527-3546.

Calva Benítez, L. G., Pérez Rojas, A., & Márquez García, A. Z. (2006). Contenido de carbono orgánico y características texturales de los sedimentos del sistema costero lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas. *Hidrobiológica*, 16(2), 127-135.

Calva Benítez, L. G., Torres Alvarado, R., Toledo, C., & Carlos, J. (2009). Carbono orgánico y características texturales de los sedimentos del sistema costero lagunar Carretas-Pereyra, Chiapas. *Hidrobiológica*, 19(1), 33-42.

Canfield, D. E., Raiswell, R., & Bottrell, S. H. (1992). The reactivity of sedimentary iron minerals toward sulfide. *American Journal of Science*, 292(9), 659-683.

Canfield, D. E., Kristensen, E., & Thamdrup, B. (2005). The iron and manganese cycles. *Advances in Marine Biology*, 48, 269-312.

Castañeda, L. O., & Contreras, F. E. (2001). Serie: Bibliografía Comentada sobre ecosistemas costeros mexicanos 2001. *Centro de Documentación Ecosistemas Litorales Mexicanos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División CBS Depto. de Hidrología. Publicación electrónica (CD). ISBN, 970-654.*

CICESE. 2009. Programa MAR V0.9 para Windows. CD- ROM.

CONAGUA, C. (2013). Estadísticas del agua en México.

CONAGUA, C. (2014). Estadísticas del agua en México.

Contreras, E. F. (2010). Ecosistemas costeros mexicanos una actualización. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 514 pp.

Contreras-Espinosa, F. (2005). Lagunas costeras de Veracruz. *Manejo Costero Integral: El Enfoque Municipal. Xalapa, Veracruz: Instituto de Ecología, AC, 205-228.*

Copeland, A. et al. (2007). Complete sequence of *Geobacter uraniireducens* Rf4. Unpublished

Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, C., Glavina, T., ...& Richardson, P. Sequencing of the draft genome and assembly of *Desulfitobacterium hafniense*. Unpublished.

Copeland, A. *et al.* (2013). Complete sequence of *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB. Unpublished.

Córdova-Kreylos, A. L., Cao, Y., Green, P. G., Hwang, H. M., Kuivila, K. M., LaMontagne, M. G., ...& Scow, K. M. (2006). Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3357-3366.

Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Aguilar, B. R., & Munive, M. G. R. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. *SEMARNAT, INECC, UAM-I*, 256.

Coyne, M. S. (1999). *Soil microbiology: an exploratory approach* (pp. 250-262). New York, NY, USA: Delmar.

Cunliffe, M., Schäfer, H., Harrison, E., Cleave, S., Upstill-Goddard, R., & Murrell, J. C. (2008). Phylogenetic and functional gene analysis of the bacterial and archaeal communities associated with the surface microlayer of an estuary. *The ISME Journal*, 2(7), 776-789.

Danovaro, R., & Pusceddu, A. (2007). Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: does microbial diversity play any role?. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 75(1), 4-12.

Dauvin, J. C., Desroy, N., Janson, A. L., Vallet, C., & Duhamel, S. (2006). Recent changes in estuarine benthic and suprabenthic communities resulting from the development of harbour infrastructure. *Marine Pollution Bulletin*, 53(1), 80-90.

De La Lanza-Espino, G. (1994). Química de las lagunas costeras y el litoral mexicano (127-198). *En: De La Lanza-Espino, G. y C. Cáceres (Eds.). Lagunas costeras y el litoral mexicano*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, 525 p.

de Wit, R., Stal, L. J., Lomstein, B. A., Herbert, R. A., Van Gemerden, H., Viaroli, P., ...& Azzoni, R. (2001). ROBUST: The Role of BUffering capacities in STabilising coastal lagoon ecosystems. *Continental Shelf Research*, 21(18), 2021-2041.

Díaz, R.J., & Rosenberg, R. (1995). Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 33, 245-303.

Dominguez, A. L. L., Day, J. W., Yanez-Arancibiai, A., & Sainz-Hernandez, E. (2006). A dynamic characterization of water flux through a tropical ephemeral inlet, La Mancha Lagoon, Gulf of Mexico. In *Coastal Hydrology and Processes: Proceedings of the AIH 25th Anniversary Meeting & International Conference "Challenges in Coastal Hydrology and Water Quality"* (p. 413). Water Resources Publication.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A., & Smith, F. (1956). Phenol sulphuric acid method for carbohydrate determination. *Analytical Chemistry*, 28, 350-359.

Dykhuizen, D. E. (1998). Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria?. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 25-33.

Eatherall, A., Naden, P. S., & Cooper, D. M. (1998). Simulating carbon flux to the estuary: The first step. *Science of the Total Environment*, 210, 519-533.

Ekborg, N. A., Gonzalez, J. M., Howard, M. B., Taylor, L. E., Hutcheson, S. W., & Weiner, R. M. (2005). *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1545-1549.

Elshahed, M. S., Bhupathiraju, V. K., Wofford, N. Q., Nanny, M. A., & McInerney, M. J. (2001). Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by "Syntrophus aciditrophicus" strain SB in syntrophic association with H₂-using microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1728-1738.

Ensor, L. A., Stosz, S. K., & Weiner, R. M. (1999). Expression of multiple complex polysaccharide-degrading enzyme systems by marine bacterium strain 2-40. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 123-126.

Fægri, A., Torsvik, V. L., & Goksöyr, J. (1977). Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(2), 105-112.

Federation, W. E., & American Public Health Association. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.

Felske, A. & Akkermans, A. D. L. (1998). Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grasslands soils. *Microbial Ecology*, 36, 31-36.

Flemming, B. W. (2000). A revised textural classification of gravel-free muddy sediments on the basis of ternary diagrams. *Continental Shelf Research*, 20(10), 1125-1137.

Flores-Verdugo, F., González-Farías, F., Ramírez-Flores, O., Amezcua-Linares, F., Yáñez-Arancibia, A., Alvarez-Rubio, M., & Day, J. W. (1990). Mangrove ecology, aquatic primary productivity, and fish community dynamics in the Teacapán-Agua Brava lagoon-estuarine system (Mexican Pacific). *Estuaries and Coasts*, 13(2), 219-230.

Folk, R.L. (1974). *Petrology of Sedimentary Rocks*. *Hempill Pub. Co., Austin, Texas*, 82p. Gastil, R.

Galván, M. A., Arias, H. M., Chávez, J., & Oropeza, J. L. (1999). Influencia del transporte fluvial de sedimentos sobre la evolución de una laguna costera. *Hidrobiológica*, 9(2), 145-158.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Liburn, T. (2005). Family II. Geobacteraceae fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part C. 2nd ed. New York: Springer*, 1017.

Gaudette, H., W. Flight, L. Toner & D. Folger. (1974). An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *Journal of Sediments and Petrology*, 44(1), 249-253.

Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., ... & Somerfield, P. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6(2), 298-308.

Gomes, N. C., Borges, L. R., Paranhos, R., Pinto, F. N., Mendonça-Hagler, L. C., & Smalla, K. (2008). Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 96-109.

Gomes, N. C., Cleary, D. F., Pinto, F. N., Egas, C., Almeida, A., Cunha, A., ... & Smalla, K. (2010). Taking root: enduring effect of rhizosphere bacterial colonization in mangroves. *PLoS One*, 5(11), e14065.

Gomes, N. C., Cleary, D. F., Calado, R., & Costa, R. (2011). Mangrove bacterial richness. *Communicative & Integrative Biology*, 4(4), 419-423.

Gomes, N. C., Manco, S. C., Pires, A. C. C., Gonçalves, S. F., Calado, R., Cleary, D. F., & Loureiro, S. (2013). Richness and composition of sediment bacterial assemblages in an Atlantic port environment. *Science of the Total Environment*, 452, 172-180.

Gontang, E. A., Fenical, W., & Jensen, P. R. (2007). Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3272-3282.

Green, S. J., Prakash, O., Gihring, T. M., Akob, D. M., Jasrotia, P., Jardine, P. M., ... & Kostka, J. E. (2010). Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3244-3254.

Green, S. J., Prakash, O., Jasrotia, P., Overholt, W. A., Cardenas, E., Hubbard, D., ...& Kostka, J. E. (2012). Denitrifying bacteria from the genus *Rhodanobacter* dominate bacterial communities in the highly contaminated subsurface of a nuclear legacy waste site. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1039-1047.

Green, A. C. (2014). The family Desulfuromonadaceae. En; *The Prokaryotes* (pp. 143-155). Springer Berlin Heidelberg.

Gutiérrez-Aguirre, M. A., de la Fuente-Betancourt, M. G., & Cervantes-Martínez, A. (2000). Biomasa y densidad de dos especies de pastos marinos en el sur de Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical*, 48(2-3), 313-316.

Hansen, J.W., Udy, J.W., Perry, C.J., Dennison, W.C., & Lomstein, B.A. (2000). Effect of the seagrass *Zostera capricorni* on sediment microbial processes. *Marine Ecology Progress Series*, 199, 83-96.

Hernández-Raquet, G., Budzinski, H., Caumette, P., Dabert, P., Le Ménach, K., & Muyzer Duran, R. (2006). Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 550-562.

Hernández-Trejo, H., Priego-Santander, A., Lopez-Portillo, J., & Isunza-Vera, E. (2006). Los paisajes físico-geográficos de los manglares de la laguna de La Mancha, Veracruz, México. *Interciencia*, 31(003), 211-219.

Holmes, D. E., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004). In situ expression of *nifD* in Geobacteraceae in subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7251-7259.

Holmes, D. E., O'neil, R. A., Vrionis, H. A., N'guessan, L. A., Ortiz-Bernad, I., Larrahondo, M. J., ...& Chavan, M. A. (2007). Subsurface clade of Geobacteraceae that predominates in a diversity of Fe (III)-reducing subsurface environments. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 1(8).

Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., ... & Schmid, B. (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, 75(1), 3-35.

Horner-Devine, M. C., Carney, K. M., & Bohannan, B. J. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1535), 113-122.

Howes, B. L., Dacey, J. W., & Wakeham, S. G. (1985). Effects of sampling technique on measurements of porewater constituents in salt marsh sediments. *Limnology and Oceanography*, 30(1), 221-227.

Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.

Hugenholtz, P., & Pace, N. R. (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology*, 14(6), 190-197.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4765-4774.

Ikenaga, M., Guevara, R., Dean, A. L., Pisani, C., & Boyer, J. N. (2010). Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient. *Microbial Ecology*, 59(2), 284-295.

Imhoff, J. F. (2005). Chromatiales ord. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 1-59.

Imhoff, J. F., & Süling, J. (1996). The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. *Archives of Microbiology*, 165(2), 106-113.

Kaiser, M. J., Attril, M. J., Jennings, S., Thomas, D. N. and others. (2005). Estuarine ecology. En: Kaiser, M. J. (ed) *Marine ecology: processes, systems, and impacts*. Oxford University Press, New York

Kelso, B., Smith, R. V., Laughlin, R. J., & Lennox, S. D. (1997). Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4679-4685.

Kennish, M.J. (1986). *Ecology of Estuaries. Physical and Chemical Aspects*. Vol I. CRC. Press, INC. USA. 254 p.

Kirchman, D. L. (2002). The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 91-100.

Kostka, J. E., Thamdrup, B., Glud, R. N., & Canfield, D. E. (1999). Rates and pathways of carbon oxidation in permanently cold Arctic sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 7-21.

Kostka, J. E., Dalton, D. D., Skelton, H., Dollhopf, S., & Stucki, J. W. (2002). Growth of iron (III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6256-626.

Kuever, J. (2014). The Family Syntrophobacteraceae. In *The Prokaryotes* (pp. 289-299). Springer Berlin Heidelberg.

Kuever, J., Rainey, F. A., & Widdel, F. (2005). Family I. Desulfuromonaceae fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2(Part C), 1006.

Lankford, R. R. (1977). Coastallagoon of Mexico. Their origin and classification. En: M. Wiley (ed.). *Estuarine Processes*. Academic Press Inc., pp. 182-215.

León-Galván, M. F., Carbajal, N., Frickey, T., & Santos, L. (2009). Microbial identification of the Nichupte-Bojorquez coastal lagoon in Cancun, Mexico. *Aquatic Ecology*, 43(2), 197-205.

Levin, L. A., Ekau, W., Gooday, A. J., Jorissen, F., Middelburg, J. J., Naqvi, S. W. A., ...& Zhang, J. (2009). Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos.

Ley, R. E., Harris, J. K., Wilcox, J., Spear, J. R., Miller, S. R., Bebout, B. M., ...& Pace, N. R. (2006). Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3685-3695.

Libes, S. (2011). *Introduction to marine biogeochemistry*. Academic Press.

Lien, T., Madsen, M., Rainey, F. A., & Birkeland, N. K. (1998). *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 1007-1013.

Lovley, D. (2006). Dissimilatory Fe (III)-and Mn (IV)-reducing prokaryotes. In *The prokaryotes* (pp. 635-658). Springer New York.

Lovley, D. R. (1991). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Microbiological reviews*, 55(2), 259-287.

Lovley, D. R., Holmes, D. E., & Nevin, K. P. (2004). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 219-286.

Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.

Lucas, S. et al. (2009). Complete sequence of *Geobacter* sp. FRC-32. Unpublished.

Maddison, D.R. (1991). The discovery and importance of multiple islands of mostparsimonious trees. *Systematic Zoology*, 40, 315-328.

Madigan, M. T. Martinko, J. M., & Parker, J. (2000). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.

Mathews, C.K., Van Holde, K.E., & Ahern, K.G. (2002). Bioquímica. tercera edición. Pearson Educación. S.A., Madrid. 1172-1173 pp.

McInerney, M. J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R. S., Rios-Hernandez, L., ... & Gunsalus, R. P. (2007). The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7600-7605.

McInerney, M. J., Struchtemeyer, C. G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A. J., Schink, B., ... & Gunsalus, R. P. (2008). Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 58-72.

Mendes, L. W., Taketani, R. G., Navarrete, A. A., & Tsai, S. M. (2012). Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in Southeastern Brazil. *Research in Microbiology*, 163(5), 366-377.

Methé, B. A., Hiorns, W. D., & Zehr, J. P. (1998). Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnology and Oceanography*, 43(2), 368-374.

Moraga, R., Galán, A., Rossello-Mora, R., Araya, R., & Valdés, J. (2014). Composición de la comunidad procariota involucrada en la producción de nitrógeno en sedimentos de la bahía Mejillones. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 225-241.

Moran, M. A., & Hodson, R. E. (2000). Bacterial production on humic and nonhumic components of dissolved organic carbon derived of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, 35, 1744-1756.

Moreno, J. R., Gorriti, M. F., Flores, M. R., & Albarracín, V. H. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *REDUCA (Biología)*, 5(5).

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 317-322.

Muyzer, G., Sorokin, D. Y., Mavromatis, K., Lapidus, A., Clum, A., Ivanova, N., ... & Kyrpides, N. C. (2011). Complete genome sequence of "Thioalkalivibrio sulfidophilus" HL-EbGr7. *Standards in Genomic Sciences*, 4(1), 23.

Mykytczuk, N. C., Wilhelm, R. C., & Whyte, L. G. (2012). *Planococcus halocryophilus* sp. nov., an extreme sub-zero species from high Arctic permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1937-1944.

Najafov, A., & Hoxhaj, G. (2016). *PCR Guru: An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists*. Academic Press.

Naushad, S., Adeolu, M., Wong, S., Sohail, M., Schellhorn, H. E., & Gupta, R. S. (2015). A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families Algiphilaceae and Solimonadaceae to the order Nevskiales ord. nov. and to create a new family within the order Xanthomonadales, the family Rhodanobacteraceae fam. nov., containing the genus *Rhodanobacter* and its closest relatives. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(2), 467-485.

Ortíz-Maya, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., Ramírez-Saad, H. C., & Ramírez, I. J. D. (2017). Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 237-246.

Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-740.

Parte, A. C. (2014). LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42, D613-D616. 10.1093/nar/gkt1111.

Pfennig, N., & Biebl, H. (1976). *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology*, 110(1), 3-12.

Piceno, Y. M., Noble, P. A., & Lovell, C. R. (1999). Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microbial Ecology*, 38, 157-167.

Plugge, C. M., Zhang, W., Scholten, J. C., & Stams, A. J. (2011). Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2.

Plugge, C. M., Henstra, A. M., Worm, P., Swarts, D. C., Paulitsch-Fuchs, A. H., Scholten, J. C., ... & McDonald, E. (2012). Complete genome sequence of *Syntrophobacter fumaroxidans* strain (MPOB T). *Standards in Genomic Sciences*, 7(1), 91.

Poppe, L. J., Knebel, H. J., Mlodzinska, Z. J., Hastings, M. E., & Seekins, B. A. (2000). Distribution of surficial sediment in Long Island Sound and adjacent waters: Texture and total organic carbon. *Journal of Coastal Research*, 567-574.

Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 817-818.

Prieur, D., Troussellier, M., Romana, A., Chamroux, S., Mevel, G., & Baleux, B. (1987). Evolution of bacterial communities in the Gironde Estuary (France) according to a salinity gradient. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 24(1), 95-108.

Prakash, O. M., Gihring, T. M., Dalton, D. D., Chin, K. J., Green, S. J., Akob, D. M., ... & Kostka, J. E. (2010). *Geobacter daltonii* sp. nov., an Fe (III)-and uranium (VI)-reducing bacterium isolated from a shallow subsurface exposed to mixed heavy metal and hydrocarbon contamination. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3), 546-553.

Preston, M. R., & Prodduturu, P. (1992). Tidal variations of particulate carbohydrates in the Mersey Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 34(1), 37-48.

Purdy, K. J., Nedwell, D. B., Martin Embley, T., & Takii, S. (2001). Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 165-168.

Ramamurthy, T., Raju, R. M., & Natarajan, R. (1990). Distribution and ecology of methanogenic bacteria in mangrove sediments of Pitchavaram, East-coast of India.

Ranjard, L., Poly, F., & Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151(3), 167-177.

Rappe, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.

Rastogi, G., Sani, R.K. (2011). Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. En: *Microbes and Microbial Technology*. Springer, New York, pp. 29.

Reese, B. K., Anderson, M. A., & Amrhein, C. (2008). Hydrogen sulfide production and volatilization in a polymictic eutrophic saline lake, Salton Sea, California. *Science of the Total Environment*, 406(1), 205-218.

Rodríguez-Valera, F. (1988) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En: *Halophilic Bacteria*. Rodríguez-Valera, F. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press.

Rodríguez-Valera, F. (1993) Introduction to saline environments. En: *The Biology of Halophilic Bacteria*. Vreeland, R., and Hochstein, L.I. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 1-23.

Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.

Rodríguez, M. B. C. (2016). Metagenomic analysis of marine sediments from the Gulf of Mexico.

Rotaru, D. E. H., Franks, A. E., Orellana, R., Risso, C., & Nevin, K. P. (2011). *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Advances in Microbial Physiology*, 59(1).

Said, O. B., Goñi-Urriza, M., El Bour, M., Aissa, P., & Duran, R. (2010). Bacterial community structure of sediments of the Bizerte lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean coastal anthropized lagoon. *Microbial Ecology*, 59(3), 445-456.

Salazar Chavez, K. (2008). Estructura poblacional de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanogenas en perfiles sedimentarios de lagunas de aguas blancas y aguas negras de la cuenca amazónica del río Beni. Tesis de Maestría, La Paz, Bolivia.

Sánchez-Andrea, I. (2012). Diversidad microbiana de los sedimentos anaerobios de río Tinto.

Sanvicente-Añorve, L., Flores-Coto, C., & Chiappa-Carrara, X. (2000). Temporal and spatial scales of ichthyoplankton distribution in the Southern Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51, 463-475.

Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 686-691.

Scott, K. M., Sievert, S. M., Abril, F. N., Ball, L. A., Barrett, C. J., Blake, R. A., ... & Detter, C. (2006). The genome of deep-sea vent chemolithoautotroph *Thiomicrospiracrunogeneta* XCL-2. *PLoS Biology*, 4(12), e383.

Shivaji, S., Srinivas, T. N. R., & Reddy, G. S. N. (2014). The Family Planococcaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 303-351). Springer Berlin Heidelberg.

Staley, J., Boone, D., Brenner, D., De Vos, P., Garrity, G., Goodfellow, M., ... & Schleifer, K. (1990). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*.

Swofford, D. L. (2001). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.068 Sinauer Sunderland. *Massachusetts, USA*.

Takai, K., & Horikoshi, K. Characterization of an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Unpublished.

Takii, S., & Fukui, M. (1991). Relative importance of methanogenesis, sulfate reduction and denitrification in sediments of the lower Tama river. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 6(1), 9-17.

Todorova, N. H., Mironova, R. S., & Karamfilov, V. K. (2014). Comparative molecular analysis of bacterial communities inhabiting pristine and polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons Black Sea coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 231-240.

Torres-Alvarado, M. D. R., Fernández, F. J., Ramírez Vives, F., & Varona-Cordero, F. (2013). Dynamics of the methanogenic archaea in tropical estuarine sediments. *Archaea*, 2013.

Torres-Alvarado, M. D. R., Calva-Benítez, L. G., Álvarez-Hernández, S., & Trejo-Aguilar, G. (2016). Anaerobic microbiota: spatial-temporal changes in the sediment of a tropical coastal lagoon with ephemeral inlet in the Gulf of Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 64(4).

Torsvik, V., Sørheim, R., & Goksøyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(3-4), 170-178.

Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066.

Travieso-Bello, A. C. (2000). Biodiversidad del paisaje costero de La Mancha, Actopan, Veracruz. Tesis. Instituto de Ecología AC. Xalapa, Veracruz, México. 119 pp.

Trüper, H. G., & Imhoff, J. F. (1981). The genus *Ectothiorhodospira*. In *The Prokaryotes* (pp. 274-278). Springer Berlin Heidelberg.

UNESCO. (1981). *Coastal Lagoon research, Present and Future. Report and Guidelines of the Seminar*. Duke University Marine Laboratory, Beaufort, N.C. USA. August, 1978. UNESCO, Technical Papers in Marine Science. N. 32.

Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., & Ohwada, K. (1999). Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 145(11), 3305-3315.

Utrera-López, M. E., & Moreno-Casasola, P. (2008). Mangrove litter dynamics in La Mancha lagoon, Veracruz, México. *Wetlands Ecology and Management*, 16(1), 11-22.

Valdez-Holguín, J. E., & Martínez-Cordova, L. R. (1993). Variabilidad de algunos parámetros fisicoquímicos y productividad primaria en la laguna La Cruz, Sonora, México. *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 41(2), 161-179.

Valette-Silver, N. J. (1993). The use of sediment cores to reconstruct historical trends in contamination of estuarine and coastal sediments. *Estuaries*, 16(3), 577-588.

Van der Leeden, F. (1990). *The water encyclopedia*. CRC Press.

Varona-Cordero, F., & Gutiérrez Mendieta, F. J. (2003). Estudio multivariado de la fluctuación espacio-temporal de la comunidad fitoplanctónica en dos lagunas costeras del estado de Chiapas. *Hidrobiológica*, 13(3), 177-194.

Varona-Cordero, F. (2011). *Influencia de las condiciones físico-químicas sobre el fitoplancton y su respuesta al enriquecimiento de nutrientes en mesocosmos en lagunas costeras mexicanas* (Doctoral dissertation, Tesis de Doctorado: Universidad Autónoma Metropolitana, DCBS).

Villalobos-Figueroa, A., M. E. Zamora, R. de la Parra V., O. Cacho R., V. Galván P. & M. A. Izaguirre P. (1984). Estudio hidrobiológico de la laguna de la Mancha, Municipio de Actopan, Veracruz. 1979-1980. Cuadernos de divulgación. INIREB 15, pp. 51.

Webster, G., Embley, T. M., & Prosser, J. I. (2002). Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of β -proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 20-30.

Weiner, R. M., Taylor II, L. E., Henrissat, B., Hauser, L., Land, M., Coutinho, P. M., ... & Bayer, E. A. (2008). Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2-40T. *PLoS Genetics*, 4(5), e1000087.

Wery, N., Cambon-Bonavita, M. A., Lesongeur, F., & Barbier, G. (2002). Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(2), 105-114.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221.

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.

Zhang, T., Bain, T. S., Barlett, M. A., Dar, S. A., Snoeyenbos-West, O. L., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2014). Sulfur oxidation to sulfate coupled with electron transfer to electrodes by *Desulfuromonas* strain TZ1. *Microbiology*, 160(1), 123-129.

Zhang, W., Ki, J. S., & Qian, P. Y. (2008)a. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(3), 668-681.

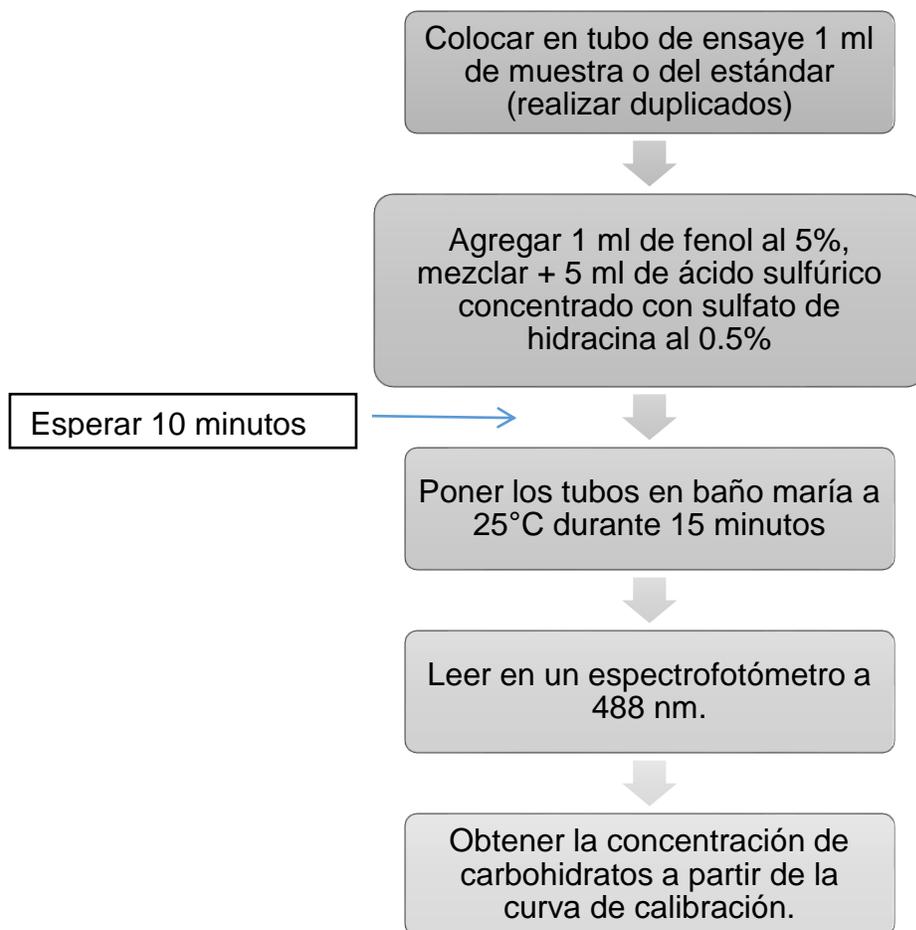
Zhang, W., Song, L. S., Ki, J. S., Lau, C. K., Li, X. D., & Qian, P. Y. (2008)b. Microbial diversity in polluted harbor sediments II: Sulfate-reducing bacterial community assessment using terminal restriction fragment length polymorphism and clone library of *dsrAB* gene. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(3), 682-691.

Zhou, J., Xia, B., Treves, D. S., Wu, L. Y., Marsh, T. L., O'Neill, R. V., ... & Tiedje, J. M. (2002). Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 326-334.

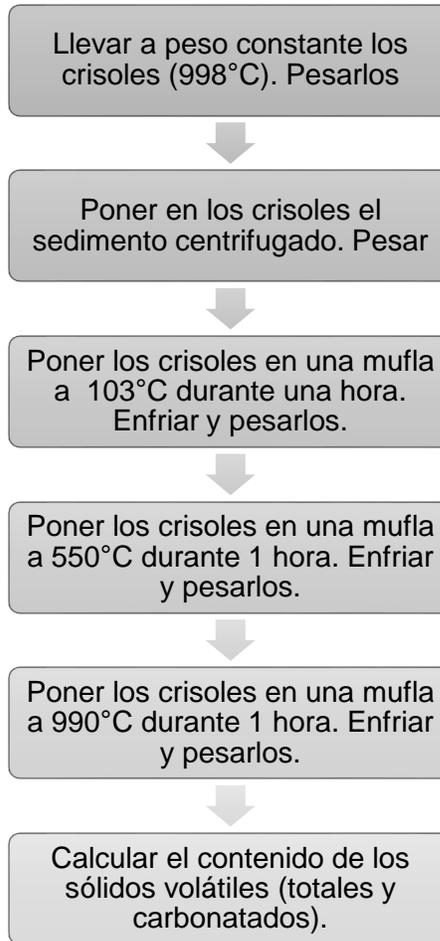
Zhou, J., Gu, Y., Zou, C., & Mo, M. (2007). Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, Southwest of China. *Journal of Microbiology-Seoul*, 45(2), 105.

ANEXOS

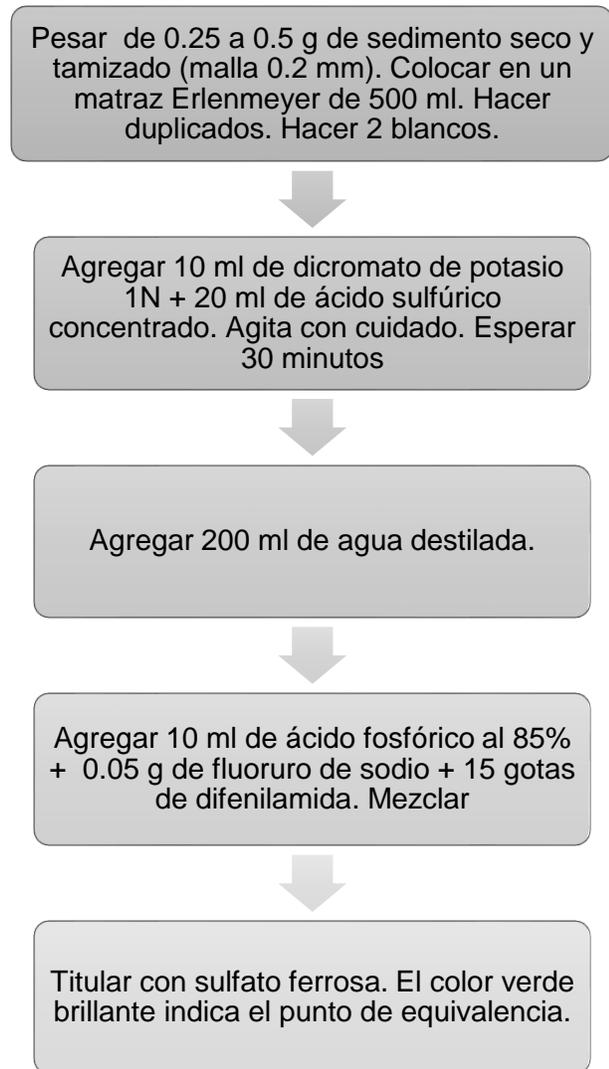
Anexo 1. Protocolo de análisis de carbohidratos.



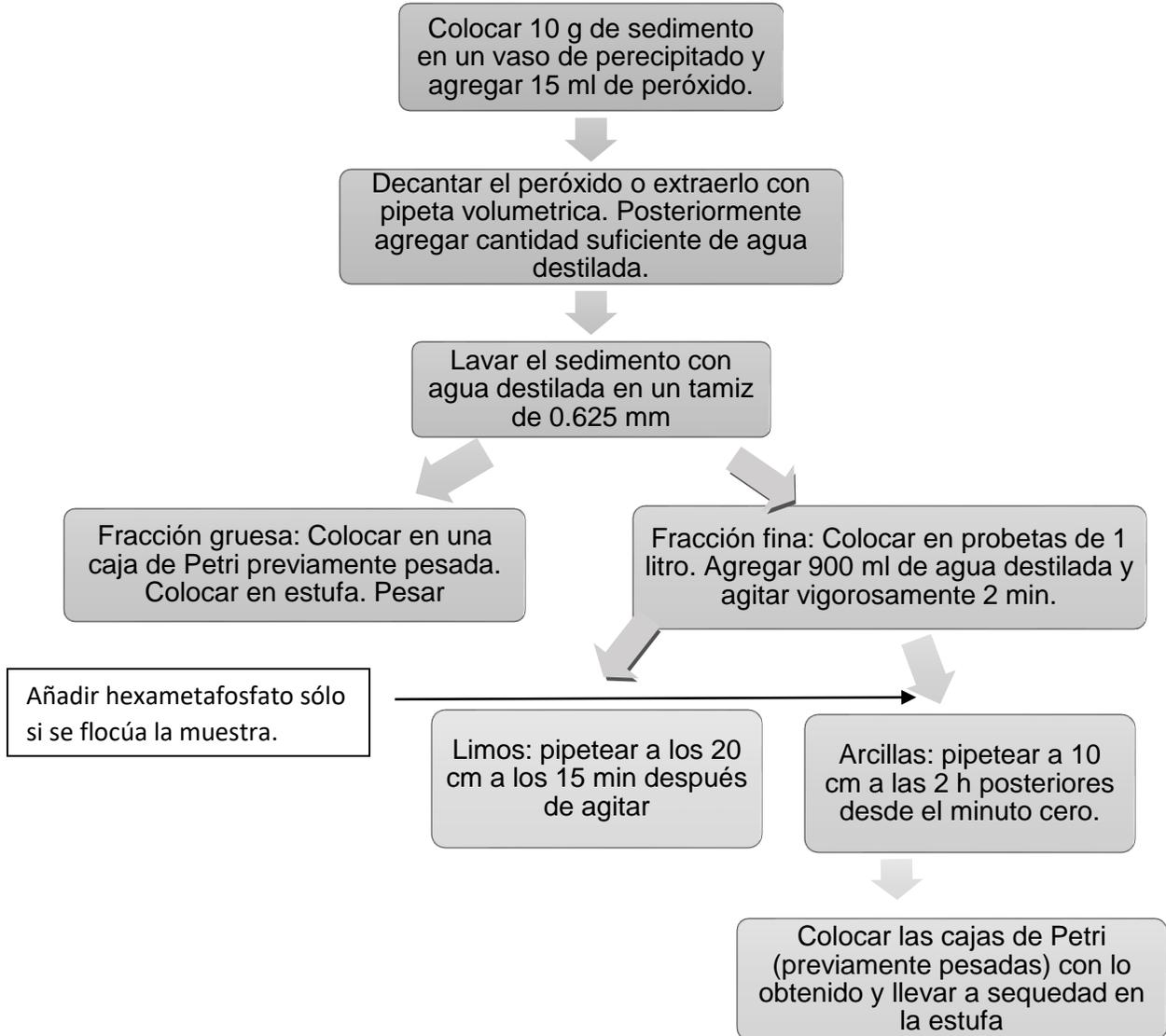
Anexo 2. Protocolo de determinación del contenido de sólidos totales y volátiles.



Anexo 3. Protocolo de determinación del contenido de carbono orgánico.



Anexo 4. Protocolo de análisis granulométrico.



*Lavar la pipeta con agua destilada en cada muestra.

*Se pueden procesar hasta nueve muestras al mismo tiempo.

Se usan tres cajas de Petri por muestra (fracción gruesa, media y fina)

Anexo 5. Taxa incluidos en el análisis filogenético para el gen ADNr 16S.

Especie	No. Acceso GenBank	Localización	Referencia	Fecha de colecta
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> ^c	NR_121678	Océano Antártico	Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, C., Glavina, T., ...& Richardson, P. Sequencing of the draft genome and assembly of <i>Desulfitobacterium hafniense</i> . Unpublished.	-
<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> ^c	NR044901	Israel, cerca de Ein Gedi en la orilla occidental del Mar Muerto	Imhoff, J. F., & Süling, J. (1996). The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. <i>Archives of microbiology</i> , 165(2), 106-113.	1990
<i>Geobacter bemidjensis</i> ^c	NR075007	USA, Minnesota, Bemidji	Aklujkar, M., Young, N.D., Holmes, D., Chavan, M., Risso, C., Kiss, H.E., Han, C.S., Land, M.L. and Lovley, D.R. (2010). The genome of <i>Geobacter bemidjensis</i> , exemplar for the subsurface clade of <i>Geobacter</i> species that predominate in Fe(III)-reducing subsurface environments. <i>BMC Genomics</i> 11, 490	2010
<i>Geobacter daltonii</i> ^c	NR074916	-	Lucas, S. <i>et al.</i> (2009). Complete sequence of <i>Geobacter</i> sp. FRC-32. Unpublished	2009
<i>Geobacter metallireducens</i> ^c	NR075011		Aklujkar, M., Krushkal, J., DiBartolo, G., Lapidus, A., Land, M. L., & Lovley, D. R. (2009). The genome sequence of <i>Geobacter metallireducens</i> : features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to <i>Geobacter sulfurreducens</i> . <i>BMC microbiology</i> , 9(1), 109.	2009
<i>Geobacter uraniireducens</i> ^c	NR074949		Copeland, A. <i>et al.</i> (2007). Complete sequence of <i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4. Unpublished	2007
<i>Planococcus halocryphilus</i> ^c	NR118149	Ártico	Mykytczuk, N. C., Wilhelm, R. C., & Whyte, L. G. (2012). <i>Planococcus halocryphilus</i> sp. nov., an extreme sub-zero species from high Arctic permafrost. <i>International journal of systematic and evolutionary microbiology</i> , 62(8), 1937-1944.	2012
<i>Rhodanobacter denitrificans</i> ^c	NR102497		Direct submission	2013
<i>Saccharophagus degradans</i> ^c	NR074359		Weiner, R. M., Taylor II, L. E., Henrissat, B., Hauser, L., Land, M., Coutinho, P. M., ...& Bayer, E. A. (2008). Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, <i>Saccharophagus degradans</i> strain 2-40T. <i>PLoS genetics</i> , 4(5),	2008

			e1000087.	
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> ^c	NR075002		Copeland, A. <i>et al.</i> (2013). Complete sequence of <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB. Unpublished.	2013
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> ^c	NR102776		McInerney, M. J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R. S., Rios-Hernandez, L., ... & Gunsalus, R. P. (2007). The genome of <i>Syntrophus aciditrophicus</i> : life at the thermodynamic limit of microbial growth. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i> , 104(18), 7600-7605.	
<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> ^c	NR074692		Muyzer, G., Sorokin, D. Y., Mavromatis, K., Lapidus, A., Clum, A., Ivanova, N., ... & Kyrpides, N. C. (2011). Complete genome sequence of "Thioalkalivibrio sulfidophilus" HL-EbGr7. <i>Standards in genomic sciences</i> , 4(1), 23.	2007
Secuencia1 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia2 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia3 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia4 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia5 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia6 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia7 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia8 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia9 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia10 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia11 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia12 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia13 ^b	NS	Laguna de la Mancha,	-	Nov 2013

		Veracruz		
Secuencia14 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia15 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Junio 2014
Secuencia16 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Junio 2014
Secuencia17 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia18 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia19 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia20 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia21 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia22 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia23 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia24 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia25 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Nov 2013
Secuencia26 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Junio 2014
Secuencia27 ^b	NS	Laguna de la Mancha, Veracruz	-	Junio 2014
<i>Petrotoga mobilis</i> SJ95 ^a	Y15479	-	Lien, T., Madsen, M., Rainey, F. A., & Birkeland, N. K. (1998). <i>Petrotoga mobilis</i> sp. nov., from a North Sea oil-production well. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> , 48(3), 1007-1013.	-
<i>Thermotoga marítima</i> ^a	M21774	-	Achenbach-Richter, L., Gupta, R., Stetter, K. O., & Woese, C. R. (1987). Were the original eubacteria thermophiles?. <i>Systematic and applied microbiology</i> , 9(1), 34-39.	-
<i>Thermosiphon japonicus</i> ^a	AB024932	-	Takai, K. and Horikoshi, K. Characterization of an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent.	-

			Unpublished.	
<i>Thermosipho</i> sp. ^a	AJ419874	-	Wery, N., Cambon-Bonavita, M. A., Lesongeur, F., & Barbier, G. (2002). Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. <i>FEMS microbiology ecology</i> , 41(2), 105-114.	-

^aGrupos externos. ^bSecuencias obtenidas en el estudio. ^cSecuencias tomadas del GenBank. NS = Secuencia no sometida a GenBank. - Datos no disponibles.

Anexo 6. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN en sedimentos.

Power Soil DNA Isolation Kit

- 1.- Pesar 0.25 g de muestra en los tubos Power Bead.
- 2.- Mezclar en vortex a velocidad media durante 10 segundos.
- 3.- Revisar la solución C1, si está precipitada se debe calentar a 60°C hasta que se disuelva.
- 4.- Adicionar a los tubos Power Bead 60 µl de la solución C1.

Agitar en vortex 5 segundos e invertir varias veces el tubo (10 veces). Velocidad máxima.

5.- Colocar los tubos Power Bead horizontalmente en el vortex y agitar a velocidad máxima durante 10 minutos.

6.- Colocar los tubos en una microcentrífuga. Centrifugar a 10,000 × g durante 30 segundos a temperatura ambiente.

7.- Transferir el sobrenadante a un microtubo limpio de 2 ml.

Se deben obtener ≈ 400-500 µl de sobrenadante.

8.- Adicionar 250 µl de la solución C2, agitar en vortex durante 5 segundos a velocidad máxima.

Incubar a 4°C durante 5 minutos.

9.- Centrifugar los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10,000 × g.

10.- Colectar el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml. No deben ser más de 600 µl. Evitar colectar el precipitado.

11.- Adicionar 200 µl de la solución C3, agitar en vortex durante 5 segundos a velocidad máxima.

Incubar a 4°C durante 5 minutos.

12.- Centrifugar los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10,000 × g.

13.- Transferir el sobrenadante, máximo 750 µl, a un tubo limpio de 2 mL. Evite el precipitado. (≈ 700 µl).

14.- Mezclar la solución C4 antes de utilizarla.

Adicionar 1200 µl al sobrenadante y agitar en vortex durante 5 segundos a velocidad máxima.

15.- Colectar 675 µl de la mezcla y colocar en un tubo con el Spin Filter.

Centrifugar a 10,000 ×g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Descartar el filtrado.

*Adicionar otros 675 µl al Spin Filter y centrifugar a 10,000 ×g durante 1 minuto a temperatura ambiente, decantar el filtrado.

Adicionar el resto del sobrenadante en el Spin Filter, centrifugar a 10,000 ×g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante.

16.- Adicionar 500 µl de la solución C5 al Spin Filter y centrifugar a 10,000 a temperatura ambiente durante 30 segundos.

Decantar el filtrado

17.- Centrifugar nuevamente a 10,000 ×g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Decantar el sobrenadante.

18.- Colocar cuidadosamente el Spin Filter en un tubo de 2 mL limpio, evitar que el Spin Filter se contamine con los residuos de la solución C6

19.- Adicionar 100 µl de la solución C6 en el centro de la membrana blanca del filtro. (Alternativamente se puede utilizar agua libre de ADN para PCR.)

(Esperar 5 minutos)

20.- Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10,000 ×g.

21.- Descartar el Spin Filter, el ADN extraído se almacena congelado (-20°C a -80°C)

NOTA:

rpm: 12,400 rpm

T ambiente: 20°C

Fórmula:

$$g = (1.118 \times 10^{-5}) (r) (s^2)$$

r= radio del rotor

s= velocidad en rpm

Anexo 7. Protocolo de purificación de ADN.

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

Procesamiento de las amplificaciones de PCR

1.-Añadir de la solución Membrane Binding un volumen igual que el producto de amplificación de la PCR.

Unión de ADN

1.- Insertar la Minicolumna SV en el tubo de colecta.

2.- Transferir el producto de la PCR al ensamble de la minicolumna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

3.- Centrifugar a 16,000 $\times g$ durante 1 minuto. Descartar el sobrenadante y reinsertar la minicolumna en el tubo de colecta.

Lavado

4.- Agregar 700 μl de Membrane Wash Solution (con etanol agregado). Centrifugar a 16,000 $\times g$ durante 1 minuto.

Descartar el sobrenadante y reinsertar la minicolumna en el tubo de colecta.

5.- Repetir el paso 4, pero con 500 μl de Membrane Wash Solution. Centrifugar a 16,000 $\times g$ durante 5 minutos.

6.- Vaciar el tubo de colecta y recentrifugar la columna durante 1 minuto sin la tapa, para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol.

Elución

7.- Transferir con cuidado la minicolumna a un tubo limpio de 1.5 ml.

8.- Adicionar 50 μl de agua libre de nucleasa a la minicolumna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

Centrifugar a 16,000 $\times g$ durante 1 minuto.

9.- Descartar la minicolumna y refrigerar el ADN a 4°C o a -20°C.

ANEXO 8. Tinción con sales de plata de geles de DGGE

- 1.- Colocar el gel en el contenedor.
- 2.- Adicionar 200 ml de la solución de fijación 1x de Cairn y agitar durante 3 minutos.
- 3.- Quitar la solución y guardarla, para su posterior aplicación.
- 4.- Agregar 200 ml de la solución de tinción de plata (usar guantes) al contenedor y agitar durante 10 min.
- 5.- Descartar la solución de tinción de plata. (Desperdicio químico).
- 6.- Agregar un poco de agua desmineralizada. (Desperdicio químico).
- 7.- Adicionar agua limpia desmineralizada y agitar durante 2 minutos.
- 8.- Descartar el agua. (Desperdicio químico).
- 9.- Enjuagar el gel y el gel bond con agua desmineralizada.
- 10.- Colocar el gel en el recipiente para revelar ("developer container").
- 11.- Agregar una pequeña parte de la solución reveladora y agitar un poco. Descartar la solución (al lavabo) y llenar el contenedor con la solución reveladora restante.
- 12.- Agitar hasta que la intensidad de las bandas sea satisfactoria (alrededor de 20 a 50 min).
- 13.- Descartar la solución reveladora. (Al lavabo).
- 14.- Adicionar los 200 ml de la solución de fijación 1x de Cairn previamente usada.
- 15.- Agitar durante 5 minutos.
- 16.- Descartar la solución 1x de Cairn.

Anexo 9. Matriz de distancias genéticas no corregidas ("p") para ADNr 16S de los taxa estudiados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Petrotaga mobilis</i>Y15479	-														
2 <i>Thermosipho japonicus</i>AB024932	0.218	-													
3 <i>Thermosipho sp.</i>AJ419874	0.197	0.037	-												
4 <i>Thermotoga maritima</i>M21774	0.234	0.090	0.122	-											
5 Secuencia 1	0.628	0.622	0.612	0.622	-										
6 Secuencia 2	0.638	0.628	0.617	0.638	0.043	-									
7 Secuencia 3	0.633	0.617	0.612	0.622	0.069	0.048	-								
8 Secuencia 4	0.638	0.622	0.617	0.633	0.080	0.048	0.032	-							
9 Secuencia 5	0.644	0.638	0.628	0.638	0.048	0.027	0.043	0.048	-						
10 Secuencia 6	0.628	0.628	0.617	0.633	0.085	0.064	0.064	0.074	0.064	-					
11 Secuencia 7	0.633	0.638	0.628	0.644	0.059	0.053	0.069	0.064	0.048	0.090	-				
12 Secuencia 8	0.324	0.266	0.266	0.229	0.574	0.574	0.559	0.580	0.580	0.574	0.585	-			
13 Secuencia 9	0.633	0.628	0.622	0.628	0.064	0.053	0.069	0.069	0.048	0.096	0.053	0.574	-		
14 Secuencia 10	0.649	0.622	0.617	0.633	0.128	0.101	0.096	0.069	0.096	0.117	0.096	0.580	0.085	-	
15 Secuencia 11	0.665	0.644	0.638	0.654	0.122	0.101	0.074	0.059	0.096	0.112	0.106	0.612	0.096	0.080	-
16 Secuencia 12	0.649	0.622	0.617	0.633	0.080	0.048	0.043	0.032	0.048	0.059	0.064	0.574	0.059	0.074	0.080
17 Secuencia 13	0.665	0.638	0.622	0.638	0.080	0.090	0.074	0.085	0.090	0.080	0.096	0.585	0.090	0.117	0.112
18 Secuencia 14	0.638	0.628	0.617	0.638	0.074	0.048	0.064	0.043	0.059	0.064	0.080	0.580	0.085	0.059	0.064
19 Secuencia 15	0.665	0.638	0.633	0.644	0.074	0.085	0.090	0.085	0.080	0.112	0.096	0.596	0.074	0.101	0.074
20 Secuencia 16	0.633	0.628	0.622	0.628	0.101	0.106	0.122	0.128	0.101	0.112	0.074	0.590	0.085	0.133	0.149
21 Secuencia 17	0.670	0.691	0.686	0.697	0.229	0.218	0.218	0.218	0.213	0.229	0.213	0.628	0.197	0.229	0.229
22 Secuencia 18	0.654	0.660	0.644	0.654	0.165	0.154	0.149	0.138	0.133	0.133	0.128	0.590	0.128	0.128	0.160
23 Secuencia 19	0.638	0.633	0.628	0.638	0.053	0.032	0.027	0.037	0.027	0.064	0.064	0.574	0.053	0.090	0.085
24 Secuencia 20	0.638	0.622	0.617	0.633	0.085	0.053	0.043	0.021	0.059	0.074	0.074	0.580	0.074	0.059	0.059
25 Secuencia 21	0.660	0.638	0.633	0.654	0.160	0.133	0.117	0.090	0.133	0.144	0.144	0.612	0.128	0.069	0.101
26 Secuencia 22	0.293	0.239	0.239	0.202	0.590	0.596	0.580	0.596	0.601	0.596	0.606	0.059	0.596	0.596	0.628
27 Secuencia 23	0.638	0.622	0.617	0.633	0.080	0.048	0.053	0.037	0.053	0.074	0.069	0.574	0.069	0.053	0.059
28 Secuencia 24	0.649	0.633	0.628	0.638	0.080	0.048	0.037	0.053	0.043	0.053	0.080	0.574	0.080	0.096	0.096
29 Secuencia 25	0.649	0.644	0.638	0.654	0.096	0.085	0.059	0.059	0.074	0.064	0.080	0.590	0.069	0.085	0.080
30 Secuencia 26	0.633	0.612	0.606	0.617	0.064	0.043	0.053	0.048	0.037	0.048	0.074	0.564	0.064	0.096	0.090
31 Secuencia 27	0.686	0.660	0.644	0.654	0.122	0.122	0.106	0.117	0.112	0.112	0.117	0.596	0.106	0.138	0.138
32 <i>Geobacter bemidjiensis</i>NR075007	0.303	0.229	0.255	0.181	0.612	0.606	0.590	0.606	0.612	0.612	0.633	0.191	0.612	0.601	0.633
33 <i>Desulfuromonas acetoxidans</i>NR121678	0.309	0.239	0.255	0.191	0.601	0.596	0.580	0.596	0.601	0.601	0.622	0.186	0.601	0.596	0.628
34 <i>Ectothiorhodospira mobilis</i>NR04490	0.282	0.234	0.234	0.170	0.580	0.574	0.569	0.585	0.580	0.585	0.601	0.170	0.590	0.580	0.612
35 <i>Geobacter daltonii</i>NR074916	0.298	0.234	0.261	0.191	0.606	0.601	0.585	0.601	0.606	0.606	0.628	0.186	0.606	0.596	0.628

Anexo 8. Continuación.

36 <i>Geobacter metallireducens</i>NR075011	0.319	0.261	0.287	0.207	0.617	0.617	0.601	0.617	0.622	0.617	0.644	0.191	0.622	0.601	0.638
37 <i>Geobacter uraniireducens</i>NR074940	0.303	0.234	0.261	0.186	0.601	0.596	0.580	0.596	0.601	0.601	0.622	0.191	0.601	0.590	0.622
38 <i>Planococcus halocryphilus</i>NR118149	0.250	0.176	0.207	0.138	0.622	0.617	0.601	0.612	0.622	0.628	0.633	0.154	0.622	0.617	0.644
39 <i>Rhodanobacter denitrificans</i>NR102497	0.298	0.234	0.239	0.191	0.590	0.585	0.569	0.585	0.590	0.596	0.612	0.144	0.590	0.585	0.617
40 <i>Saccharophagus degradans</i>NR074359	0.255	0.255	0.255	0.213	0.580	0.574	0.559	0.574	0.580	0.580	0.601	0.117	0.580	0.585	0.606
41 <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>NR075002	0.303	0.223	0.250	0.181	0.606	0.606	0.590	0.606	0.612	0.601	0.628	0.165	0.606	0.606	0.638
42 <i>Syntrophus aciditrophicus</i>NR102776	0.330	0.245	0.271	0.223	0.606	0.601	0.596	0.606	0.617	0.606	0.628	0.207	0.606	0.606	0.638
43 <i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>NR074692	0.277	0.239	0.239	0.186	0.580	0.574	0.569	0.585	0.580	0.585	0.601	0.160	0.590	0.590	0.612

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

16 Secuencia 12	-															
17 Secuencia 13	0.064	-														
18 Secuencia 14	0.048	0.090	-													
19 Secuencia 15	0.085	0.074	0.080	-												
20 Secuencia 16	0.117	0.106	0.122	0.106	-											
21 Secuencia 17	0.207	0.207	0.223	0.218	0.213	-										
22 Secuencia 18	0.128	0.128	0.128	0.154	0.112	0.218	-									
23 Secuencia 19	0.037	0.090	0.059	0.085	0.117	0.213	0.144	-								
24 Secuencia 20	0.037	0.090	0.037	0.085	0.138	0.223	0.133	0.043	-							
25 Secuencia 21	0.106	0.149	0.096	0.128	0.191	0.266	0.186	0.122	0.085	-						
26 Secuencia 22	0.596	0.601	0.596	0.606	0.606	0.638	0.601	0.596	0.596	0.628	-					
27 Secuencia 23	0.037	0.080	0.027	0.080	0.112	0.207	0.138	0.048	0.027	0.090	0.596	-				
28 Secuencia 24	0.037	0.080	0.059	0.101	0.122	0.218	0.154	0.037	0.048	0.128	0.596	0.043	-			
29 Secuencia 25	0.048	0.048	0.069	0.074	0.117	0.213	0.112	0.064	0.064	0.106	0.612	0.059	0.074	-		
30 Secuencia 26	0.043	0.085	0.059	0.085	0.096	0.223	0.149	0.043	0.053	0.128	0.585	0.048	0.037	0.080	-	
31 Secuencia 27	0.085	0.053	0.133	0.101	0.106	0.213	0.106	0.112	0.122	0.170	0.606	0.122	0.112	0.085	0.117	
32 <i>Geobacter bemidjensis</i>NR075007	0.612	0.628	0.601	0.628	0.628	0.670	0.644	0.606	0.606	0.628	0.165	0.606	0.606	0.633	0.601	
33 <i>Desulfuromonas acetoxidans</i>NR121678	0.601	0.617	0.596	0.617	0.617	0.654	0.638	0.596	0.596	0.612	0.165	0.596	0.596	0.622	0.590	
34 <i>Ectothiohordospira mobilis</i>NR04490	0.590	0.606	0.569	0.606	0.612	0.644	0.606	0.585	0.585	0.606	0.133	0.585	0.585	0.612	0.585	
35 <i>Geobacter daltonii</i>NR074916	0.606	0.617	0.596	0.622	0.622	0.654	0.633	0.601	0.601	0.622	0.165	0.601	0.601	0.622	0.596	
36 <i>Geobacter metallireducens</i>NR075011	0.622	0.633	0.612	0.633	0.638	0.676	0.654	0.612	0.617	0.628	0.181	0.617	0.617	0.638	0.612	
37 <i>Geobacter uraniireducens</i>NR074940	0.601	0.617	0.590	0.617	0.617	0.660	0.633	0.596	0.596	0.617	0.170	0.596	0.596	0.622	0.590	

38 <i>Planococcus halocryphilus</i>NR118149	0.622	0.633	0.622	0.644	0.628	0.660	0.649	0.617	0.612	0.633	0.128	0.612	0.617	0.638	0.617
39 <i>Rhodanobacter denitrificans</i>NR102497	0.590	0.606	0.585	0.606	0.622	0.654	0.622	0.585	0.585	0.601	0.117	0.585	0.585	0.612	0.585

Anexo 8. Continuación.

40 <i>Saccharophagus degradans</i>NR074359	0.580	0.590	0.574	0.596	0.606	0.622	0.601	0.574	0.574	0.612	0.080	0.574	0.574	0.596	0.569
41 <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>NR075002	0.606	0.628	0.606	0.622	0.617	0.681	0.638	0.606	0.606	0.628	0.160	0.606	0.606	0.628	0.590
42 <i>Syntrophus aciditrophicus</i>NR102776	0.606	0.622	0.606	0.617	0.617	0.676	0.644	0.612	0.606	0.628	0.191	0.606	0.612	0.633	0.590
43 <i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>NR074692	0.590	0.606	0.569	0.606	0.612	0.638	0.606	0.585	0.585	0.617	0.122	0.585	0.585	0.612	0.585

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43

31 Secuencia 27	-														
32 <i>Geobacter bemidjiensis</i>NR075007	0.644	-													
33 <i>Desulfuromonas acetoxidans</i>NR121678	0.633	0.059	-												
34 <i>Ectothiohordospira mobilis</i>NR04490	0.617	0.112	0.117	-											
35 <i>Geobacter daltonii</i>NR074916	0.638	0.037	0.064	0.117	-										
36 <i>Geobacter metallireducens</i>NR075011	0.649	0.043	0.080	0.122	0.053	-									
37 <i>Geobacter uraniireducens</i>NR074940	0.633	0.032	0.059	0.112	0.005	0.048	-								
38 <i>Planococcus halocryphilus</i>NR118149	0.654	0.128	0.138	0.128	0.128	0.144	0.133	-							
39 <i>Rhodanobacter denitrificans</i>NR102497	0.622	0.096	0.101	0.090	0.112	0.117	0.106	0.122	-						
40 <i>Saccharophagus degradans</i>NR074359	0.606	0.138	0.128	0.096	0.122	0.149	0.128	0.117	0.080	-					
41 <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>NR075002	0.644	0.112	0.112	0.154	0.117	0.106	0.112	0.138	0.128	0.170	-				
42 <i>Syntrophus aciditrophicus</i>NR102776	0.638	0.117	0.128	0.176	0.112	0.117	0.106	0.160	0.170	0.186	0.106	-			
43 <i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>NR074692	0.617	0.117	0.122	0.043	0.128	0.133	0.122	0.117	0.085	0.085	0.144	0.165	-		

Anexo 10. Distancias genéticas entre géneros y secuencias obtenidas en el trabajo.

Secuencias obtenidas en el trabajo/Géneros	<i>Petrotaga</i>	<i>Thermosipo</i>	<i>Thermotaga</i>	<i>Planococcus</i>	<i>Rhodanobacter</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>
Secuencia 1	62.8	62.2	62.2	62.2	59.0	58.0
Secuencia 2	63.8	62.8	63.8	61.7	58.5	57.4
Secuencia 3	63.3	61.7	62.2	60.1	56.9	56.9
Secuencia 4	63.8	62.2	63.3	61.2	58.5	58.5
Secuencia 5	64.4	63.8	63.8	62.2	59.0	58.0
Secuencia 6	62.8	62.8	63.3	62.8	59.6	58.5
Secuencia 7	64.3	63.8	64.4	63.3	61.2	60.1
Secuencia 8	32.4	26.6	22.9	15.4	14.4	17.0
Secuencia 9	63.3	62.8	62.8	62.2	59.0	59.0
Secuencia 10	64.9	62.2	63.3	61.7	58.5	58.0
Secuencia 11	66.5	64.4	65.4	64.4	61.7	61.2
Secuencia 12	64.9	62.2	63.3	62.2	59.0	59.0
Secuencia 13	66.5	63.8	63.8	63.3	60.6	60.6
Secuencia 14	63.8	62.8	63.8	62.2	58.5	56.9
Secuencia 15	66.5	63.8	64.4	64.4	60.6	60.6
Secuencia 16	63.3	62.8	62.8	62.8	62.2	61.2
Secuencia 17	67.0	69.1	69.7	66.0	65.4	64.4
Secuencia 18	65.4	66.0	65.4	64.9	62.2	60.6
Secuencia 19	63.8	63.3	63.8	61.7	58.5	58.5
Secuencia 20	63.8	62.2	63.3	61.2	58.5	58.5
Secuencia 21	66.0	63.8	65.4	63.3	60.1	60.6
Secuencia 22	29.3	23.9	20.2	12.8	11.7	13.3
Secuencia 23	63.8	62.2	63.3	61.2	58.5	58.5
Secuencia 24	64.9	63.3	63.8	61.7	58.5	58.5
Secuencia 25	64.9	64.4	65.4	63.9	61.2	61.2
Secuencia 26	63.3	61.2	61.0	61.7	58.5	58.5
Secuencia 27	68.6	66.0	65.4	65.4	62.2	61.7

Secuencias obtenidas en el trabajo/Géneros	<i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Desulfuromonas</i>	<i>Geobacter</i>	<i>Syntrophobacter</i>	<i>Syntrophus</i>	<i>Saccharophagus</i>
Secuencia 1	58.0	60.1	61.2	60.6	60.6	58.0
Secuencia 2	57.4	59.6	60.6	60.6	60.1	57.4
Secuencia 3	56.9	58.0	59.0	59.0	59.6	55.9
Secuencia 4	58.5	59.6	60.6	60.6	60.6	57.4
Secuencia 5	58.0	60.1	61.2	61.2	61.7	58.0
Secuencia 6	58.5	60.1	61.2	60.1	60.6	58.0
Secuencia 7	60.1	62.2	63.3	62.8	62.8	60.1
Secuencia 8	16.0	18.6	19.1	16.5	20.0	11.7
Secuencia 9	59.0	60.1	61.2	60.6	60.6	58.0
Secuencia 10	59.0	59.6	60.1	60.6	60.6	58.5
Secuencia 11	61.2	62.8	63.3	63.8	63.8	60.6
Secuencia 12	59.0	60.1	61.2	60.6	60.6	58.0

Secuencia 13	60.6	61.7	62.8	62.8	62.2	59.0
Secuencia 14	56.9	59.6	60.1	60.6	60.6	57.4
Secuencia 15	60.6	61.7	62.8	62.2	61.7	59.6
Secuencia 16	61.2	61.7	62.8	61.7	61.7	60.6
Secuencia 17	63.8	65.4	67.0	68.1	67.6	62.2
Secuencia 18	60.6	63.8	64.4	63.8	64.4	60.1
Secuencia 19	58.5	59.6	60.6	60.6	61.2	57.4
Secuencia 20	58.5	59.6	60.6	60.6	60.6	57.4
Secuencia 21	61.7	61.2	62.8	62.8	62.8	61.2
Secuencia 22	12.2	16.5	16.5	16.0	19.1	08.0
Secuencia 23	58.5	59.6	60.6	60.6	60.6	57.4
Secuencia 24	58.5	59.6	60.6	60.6	61.2	57.4
Secuencia 25	61.2	62.2	63.3	62.8	63.3	59.6
Secuencia 26	58.5	59.0	60.1	59.0	59.0	56.9
Secuencia 27	61.7	63.3	64.4	64.4	63.8	60.6

Anexo 11. Valores de divergencia genética obtenidos entre las muestras secuenciadas en el estudio.

Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 1	Secuencia 2	4.4	Secuencia 1	Secuencia 15	7.8
	Secuencia 3	7.3		Secuencia 16	10.9
	Secuencia 4	8.4		Secuencia 17	27.3
	Secuencia 5	4.9		Secuencia 18	18.6
	Secuencia 6	9.0		Secuencia 19	5.5
	Secuencia 7	6.1		Secuencia 20	9.0
	Secuencia 8	8.9		Secuencia 21	17.9
	Secuencia 9	6.7		Secuencia 22	16.1
	Secuencia 10	14.0		Secuencia 23	8.4
	Secuencia 11	13.4		Secuencia 24	8.4
	Secuencia 12	8.4		Secuencia 25	10.2
	Secuencia 13	8.4		Secuencia 26	6.7
	Secuencia 14	7.8		Secuencia 27	13.4
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 2	Secuencia 3	4.9	Secuencia 2	Secuencia 15	9.0
	Secuencia 4	4.9		Secuencia 16	11.5
	Secuencia 5	2.7		Secuencia 17	25.8
	Secuencia 6	6.7		Secuencia 18	17.3
	Secuencia 7	5.5		Secuencia 19	3.3
	Secuencia 8	108.9		Secuencia 20	5.5
	Secuencia 9	5.5		Secuencia 21	14.6
	Secuencia 10	10.9		Secuencia 22	118.6
	Secuencia 11	10.9		Secuencia 23	4.9
	Secuencia 12	4.9		Secuencia 24	4.9
	Secuencia 13	9.6		Secuencia 25	9.0
	Secuencia 14	4.9		Secuencia 26	4.4
				Secuencia 27	13.4
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 3	Secuencia 4	3.3	Secuencia 3	Secuencia 16	13.4
	Secuencia 5	4.4		Secuencia 17	25.8
	Secuencia 6	6.7		Secuencia 18	16.6
	Secuencia 7	7.3		Secuencia 19	2.7
	Secuencia 8	102.4		Secuencia 20	4.4
	Secuencia 9	7.3		Secuencia 21	12.7

	Secuencia 10	10.2		Secuencia 22	111.2
	Secuencia 11	7.8		Secuencia 23	5.5
	Secuencia 12	4.4		Secuencia 24	3.8
	Secuencia 13	7.8		Secuencia 25	6.1
	Secuencia 14	6.7		Secuencia 26	5.5
	Secuencia 15	9.6		Secuencia 27	11.5
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 4	Secuencia 5	4.9	Secuencia 4	Secuencia 16	1.4
	Secuencia 6	7.8		Secuencia 17	25.8
	Secuencia 7	6.7		Secuencia 18	15.3
	Secuencia 8	111.2		Secuencia 19	3.8
	Secuencia 9	7.3		Secuencia 20	2.2
	Secuencia 10	7.3		Secuencia 21	9.6
	Secuencia 11	6.1		Secuencia 22	118.6
	Secuencia 12	3.3		Secuencia 23	3.8
	Secuencia 13	9.0		Secuencia 24	5.5
	Secuencia 14	4.4		Secuencia 25	6.1
	Secuencia 15	9.0		Secuencia 26	4.9
				Secuencia 27	12.7
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia 27	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 5	Secuencia 6	6.7	Secuencia 5	Secuencia 17	2.5
	Secuencia 7	4.9		Secuencia 18	14.6
	Secuencia 8	111.2		Secuencia 19	2.7
	Secuencia 9	4.9		Secuencia 20	6.1
	Secuencia 10	10.2		Secuencia 21	14.6
	Secuencia 11	10.2		Secuencia 22	121.2
	Secuencia 12	4.9		Secuencia 23	5.5
	Secuencia 13	9.6		Secuencia 24	4.4
	Secuencia 14	6.1		Secuencia 25	7.8
	Secuencia 15	8.4		Secuencia 26	3.8
	Secuencia 16	10.9		Secuencia 27	12.1
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 6	Secuencia 7	9.6	Secuencia 6	Secuencia 17	27.3
	Secuencia 8	108.9		Secuencia 18	14.6
	Secuencia 9	10.2		Secuencia 19	6.7
	Secuencia 10	12.7		Secuencia 20	7.8
	Secuencia 11	12.1		Secuencia 21	15.9
	Secuencia 12	6.1		Secuencia 22	118.6

	Secuencia 13	8.4		Secuencia 23	7.8
	Secuencia 14	6.7		Secuencia 24	5.5
	Secuencia 15	12.1		Secuencia 25	6.7
	Secuencia 16	12.1		Secuencia 26	4.9
				Secuencia 27	12.1
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia 27	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 7	Secuencia 8	113.6	Secuencia 7	Secuencia 18	14.0
	Secuencia 9	5.5		Secuencia 19	6.7
	Secuencia 10	10.2		Secuencia 20	7.8
	Secuencia 11	11.5		Secuencia 21	15.9
	Secuencia 12	6.7		Secuencia 22	124.0
	Secuencia 13	10.2		Secuencia 23	7.3
	Secuencia 14	8.4		Secuencia 24	8.4
	Secuencia 15	10.2		Secuencia 25	8.4
	Secuencia 16	7.8		Secuencia 26	7.8
	Secuencia 17	25.0		Secuencia 27	12.7
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 8	Secuencia 9	108.9	Secuencia 8	Secuencia 18	116.1
	Secuencia 10	111.2		Secuencia 19	108.9
	Secuencia 11	126.8		Secuencia 20	111.2
	Secuencia 12	108.9		Secuencia 21	126.8
	Secuencia 13	113.6		Secuencia 22	6.1
	Secuencia 14	111.2		Secuencia 23	108.9
	Secuencia 15	118.6		Secuencia 24	108.9
	Secuencia 16	116.1		Secuencia 25	116.1
	Secuencia 17	136.0		Secuencia 26	104.5
				Secuencia 27	118.6
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia 27	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 9	Secuencia 10	9.0	Secuencia 9	Secuencia 19	5.5
	Secuencia 11	10.2		Secuencia 20	7.8
	Secuencia 12	6.1		Secuencia 21	14.0
	Secuencia 13	9.6		Secuencia 22	118.6
	Secuencia 14	9.0		Secuencia 23	7.3
	Secuencia 15	7.8		Secuencia 24	8.4
	Secuencia 16	9.0		Secuencia 25	7.3
	Secuencia 17	22.8		Secuencia 26	6.7
	Secuencia 18	14.0		Secuencia 27	11.5
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)

		(%)			
Secuencia 10	Secuencia 11	8.4	Secuencia 10	Secuencia 19	9.6
	Secuencia 12	7.8		Secuencia 20	6.1
	Secuencia 13	12.7		Secuencia 21	7.3
	Secuencia 14	6.1		Secuencia 22	118.6
	Secuencia 15	10.9		Secuencia 23	5.5
	Secuencia 16	14.6		Secuencia 24	10.2
	Secuencia 17	27.3		Secuencia 25	9.0
	Secuencia 18	14.0		Secuencia 26	10.2
				Secuencia 27	15.3
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia 27	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 11	Secuencia 12	8.4	Secuencia 11	Secuencia 20	6.1
	Secuencia 13	12.1		Secuencia 21	10.9
	Secuencia 14	6.7		Secuencia 22	136.0
	Secuencia 15	7.8		Secuencia 23	6.1
	Secuencia 16	16.6		Secuencia 24	10.2
	Secuencia 17	27.3		Secuencia 25	8.4
	Secuencia 18	17.9		Secuencia 26	9.6
	Secuencia 19	9.0		Secuencia 27	15.3
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 12	Secuencia 13	6.7	Secuencia 12	Secuencia 20	3.8
	Secuencia 14	4.9		Secuencia 21	11.5
	Secuencia 15	9.0		Secuencia 22	118.6
	Secuencia 16	12.7		Secuencia 23	3.8
	Secuencia 17	24.3		Secuencia 24	3.8
	Secuencia 18	14.0		Secuencia 25	4.9
	Secuencia 19	3.8		Secuencia 26	4.4
				Secuencia 27	9.0
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia 27	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 13	Secuencia 14	9.6	Secuencia 13	Secuencia 21	16.6
	Secuencia 15	7.8		Secuencia 22	121.2
	Secuencia 16	11.5		Secuencia 23	8.4
	Secuencia 17	24.3		Secuencia 24	8.4
	Secuencia 18	14.0		Secuencia 25	4.9
	Secuencia 19	9.6		Secuencia 26	9.0
	Secuencia 20	9.6		Secuencia 27	5.5
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)

Secuencia 14	Secuencia 15	8.4	Secuencia 14	Secuencia 21	10.2
	Secuencia 16	13.4		Secuencia 22	118.6
	Secuencia 17	26.5		Secuencia 23	2.7
	Secuencia 18	14.0		Secuencia 24	6.1
	Secuencia 19	6.1		Secuencia 25	7.3
	Secuencia 20	3.8		Secuencia 26	6.1
				Secuencia 27	14.6
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 15	Secuencia 16	11.5	Secuencia 15	Secuencia 22	124.0
	Secuencia 17	25.8		Secuencia 23	8.4
	Secuencia 18	17.3		Secuencia 24	10.9
	Secuencia 19	9.0		Secuencia 25	7.8
	Secuencia 20	9.0		Secuencia 26	9.0
	Secuencia 21	14.0		Secuencia 27	10.9
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 16	Secuencia 17	25.0	Secuencia 16	Secuencia 23	12.1
	Secuencia 18	12.1		Secuencia 24	13.4
	Secuencia 19	12.7		Secuencia 25	12.7
	Secuencia 20	15.3		Secuencia 26	10.2
	Secuencia 21	22.1		Secuencia 27	11.5
	Secuencia 22	124.0			
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 17	Secuencia 18	25.8	Secuencia 17	Secuencia 23	24.3
	Secuencia 19	25.0		Secuencia 24	25.8
	Secuencia 20	26.5		Secuencia 25	25.0
	Secuencia 21	32.8		Secuencia 26	26.5
	Secuencia 22	142.8		Secuencia 27	25.0
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 18	Secuencia 19	15.9	Secuencia 18	Secuencia 24	17.3
	Secuencia 20	14.6		Secuencia 25	12.1
	Secuencia 21	21.4		Secuencia 26	16.6
	Secuencia 22	121.2		Secuencia 27	11.5
	Secuencia 23	15.3			
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 19	Secuencia 20	4.4	Secuencia 19	Secuencia 24	3.8
	Secuencia 21	13.4		Secuencia 25	6.7

	Secuencia 22	118.6		Secuencia 26	4.4
	Secuencia 23	4.9		Secuencia 27	12.1
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 20	Secuencia 21	9.0	Secuencia 20	Secuencia 25	6.7
	Secuencia 22	118.6		Secuencia 26	5.5
	Secuencia 23	2.7		Secuencia 27	13.4
	Secuencia 24	4.9			
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 21	Secuencia 22	136.0	Secuencia 21	Secuencia 25	11.5
	Secuencia 23	9.6		Secuencia 26	14.0
	Secuencia 24	14.0		Secuencia 27	19.3
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 22	Secuencia 23	118.6	Secuencia 22	Secuencia 26	113.6
	Secuencia 24	118.6		Secuencia 27	124.0
	Secuencia 25	126.8			
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 23	Secuencia 24	4.4	Secuencia 24	Secuencia 25	7.8
	Secuencia 25	6.1		Secuencia 26	3.8
	Secuencia 26	4.9		Secuencia 27	12.1
	Secuencia 27	13.4			
Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)	Secuencia A	Secuencia B	Intervalo de divergencia (%)
Secuencia 25	Secuencia 26	8.4	Secuencia 26	Secuencia 27	12.7
	Secuencia 27	9.0			



IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LA
COMPOSICIÓN MICROBIANA EN
SEDIMENTOS DE UNA LAGUNA
COSTERA DE BOCA EFIMERA (LA
MANCHA, VERACRUZ)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 5 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DRA. MONICA DEL PILAR BONILLA SALINAS
DRA. LAURA GEORGINA CALVA BENITEZ
DRA. JHOANA DIAZ LARREA



THALIA SANDOVAL ALEJALDRE
ALUMNA

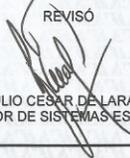
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA
DE: THALIA SANDOVAL ALEJALDRE

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

Aprobar

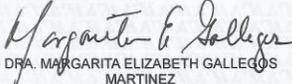
REVISÓ



LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

SECRETARIA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN DE
CBS



DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS
MARTINEZ

PRESIDENTE



DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL



DRA. MONICA DEL PILAR BONILLA SALINAS

VOCAL



DRA. LAURA GEORGINA CALVA BENITEZ

SECRETARIA



DRA. JHOANA DIAZ LARREA