



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Estudio de los procesos de metanogénesis y
sulfato reducción en tapetes microbianos de
ambientes hipersalinos”**

Tesis que presenta

Santiago Cadena Rodríguez

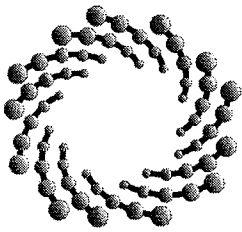
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Codirectores de la Tesis:

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano y Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre 2016



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Estudio de los procesos de metanogénesis y sulfato reducción en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Santiago Cadena Rodríguez** y aprobada el **veintiocho de octubre del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Codirector de la tesis



Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Codirectora de la tesis



Dr. José Quinatzin García Maldonado
Miembro del Comité Tutorial



Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Miembro del Comité Tutorial

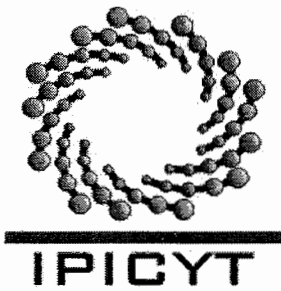


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano y el Dr. Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (140715) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

La investigación desarrollada en este trabajo ha sido financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondo Fronteras de la Ciencia, proyecto 1289) y por la Fundación Marcos Moshinsky.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 039 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de octubre del año 2016, se reunió a las 15:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Presidente

IPICYT

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano

Secretaria

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Santiago Cadena Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Estudio de los procesos de metanogénesis y sulfato reducción en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de octubre de 2016.

Dr. Márcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Posgrado



Agradecimientos

Un fuerte agradecimiento al Dr. Francisco Cervantes y a la Dra. Esmeralda López por su paciencia y respaldo.

Gracias a mi comité tutorial, la Dra. Berenice Celis y el Dr. José García por sus valiosas aportaciones a mi formación y su contribución para este trabajo.

Gracias a todo el incontable personal de laboratorio que me ayudó a sacar la tesis adelante, particularmente a los técnicos de la División de Ciencias Ambientales, la M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez y al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar.

Y por supuesto un especial agradecimiento a mis padres. A mi madre por nunca quitarme su apoyo en todo este tiempo y a mi padre por tolerarme y ayudarme en todo. Los amo, les debo todo a uds.

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	II
Créditos institucionales	III
Acta de examen	VI
Agradecimientos	V
Lista de Tablas	VIII
Lista de Figuras Resumen	IX
Resumen	X
Abstract	XI
Marco teórico	1
Ambientes hipersalinos	1
Tapetes microbianos de ambientes hipersalinos	3
Procesos microbianos en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos	3
Competencia entre metanogénesis y sulfato reducción	4
Metanogénesis y sulfato reducción en ambientes hipersalinos	7
Trimetilamina y metanol como sustratos en ambientes hipersalinos	8
Justificación	10
Objetivos e Hipótesis	11
Metodología	12
Trabajo de campo	12
Trabajo experimental	13

Métodos analíticos	14
Resultados	15
Incubaciones con hidrógeno	15
Incubaciones con lactato	15
Incubaciones con acetato	18
Incubaciones con metanol	19
Incubaciones con trimetilamina	22
Comparación de procesos sulfato-reductores	24
Comparación de procesos metanogénicos	26
Discusión	28
Conclusiones	39
Bibliografía	40

Lista de tablas

1. Reacciones y energías de reacción para la metanogénesis y la sulfato reducción utilizando distintos sustratos ecológicamente relevantes.	6
2. Diseño experimental con los distintos sustratos evaluados	14
3. Tasas respiratorias máximas sulfato reductoras y metanogénicas utilizando distintos sustratos en muestras de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos	26
4. Balance de DQO del uso de distintos sustratos por tapetes microbianos hipersalinos después de 58 días de incubación.	28

Lista de figuras

1. Localidades de ambientes hipersalinos reconocidos alrededor del mundo	2
2. Degradación de la materia orgánica en presencia y ausencia de sulfato	5
3 Salinera solar Exportadora de Sal, Guerrero Negro, BCS, México.	12
4 Producción de sulfuro de hidrógeno en los enriquecimientos con hidrógeno	15
5 Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos con lactato	17
6 Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos de acetato	19
7 Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos con metanol	21
8 Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos con trimetilamina	23
9 Producción de amonio en experimentos de trimetilamina	24
10 Uso de sustratos para la sulfato reducción	25
11 Uso de sustratos para la metanogénesis	27

Resumen

Estudio de los procesos de metanogénesis y sulfato reducción, en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos

En ambientes hipersalinos, la metanogénesis ocurre típicamente a partir de compuestos metilados, principalmente trimetilamina y metanol, los cuales han sido denominados como sustratos “no competitivos”. En el presente trabajo, a través de incubaciones de microcosmos, se evaluó la competencia por diferentes sustratos entre arqueobacterias metanogénicas y bacterias sulfato reductoras, en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos de Guerrero Negro, Baja California Sur, México. Los sustratos que más estimularon la sulfato reducción fueron el acetato y el lactato, con tasas respiratorias máximas de 5.88 y 2.57 mmol por gramo de sedimento por día (mmol/gsed -d) cada uno, mientras que, los sustratos preferentes para la metanogénesis, fueron la trimetilamina y el metanol, con tasas respiratorias de 1.09 y 0.92 mmol/gsed -d, respectivamente. Se encontró que tanto la trimetilamina como el metanol, son sustratos potenciales para la sulfato reducción en estos ecosistemas. Por otro lado, en las incubaciones donde el sulfato fue retirado, se detectó actividad metanogénica acetoclástica, la cual no había sido previamente reportada en ecosistemas hipersalinos. El presente estudio aporta nueva información sobre el uso de sustratos por arqueobacterias metanogénicas y bacterias sulfato reductoras en ambientes hipersalinos y sobre la compartición de sustratos por ambos grupos microbianos, sugiriendo abrir de nuevo la discusión si realmente existen sustratos exclusivos para la metanogénesis en estos ecosistemas.

PALABRAS CLAVE: Ambientes hipersalinos, tapetes microbianos, metanogénesis, sulfato reducción.

Abstract

Study of methanogenesis and sulfate reduction processes in hypersaline microbial mats

Methanogenesis in hypersaline environments typically occurs from methylated compounds, mainly trimethylamine and methanol, which have been called as "non-competitive" substrates. In this work, through microcosm incubations, competition of different substrates was evaluated between methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. Acetate and lactate promoted sulfate reduction with maximal respiratory rates of 5.88 and 2.57 mmol per gram of sediment per day (mmol/gsed-d). Preferred substrates for methanogenesis were trimethylamine and methanol, with respiratory rates of 1.09 and 0.92 mmol/gsed-d, respectively. We found that both trimethylamine and methanol, are potential substrates for sulfate reduction in these ecosystems. Furthermore, in incubations where sulfate was removed, acetoclastic methanogenic activity was detected, which had not previously been reported in hypersaline ecosystems. This study provides new information on the use of substrates by methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in hypersaline environments and sharing substrates by both microbial groups, suggesting reopen the discussion if there really exist "non-competitive" substrates for methanogenesis in these ecosystems.

KEY WORDS: Hypersaline environments, microbial mats, methanogenesis, sulfate reduction.

1 Marco Teórico

1.1 Ambientes hipersalinos

En nuestro planeta podemos encontrar una gran diversidad de ecosistemas naturales. Un tipo de ecosistema es el hipersalino, el cual se caracteriza por presentar altas concentraciones de sales. La salinidad en el agua de mar es de alrededor de 3.5 g/l, siendo el cloruro de sodio el principal componente. Se define como ambiente hipersalino aquél en donde la sal cristalice por saturación o donde la concentración de sal sea mayor al agua de mar (Litchfield 1998 y McGenity 2010).

Los ambientes hipersalinos se forman a través de distintos procesos naturales. Pueden existir en forma de yacimientos geológicos de cloruro de sodio superficiales (como las minas de sal) o de profundidades oceánicas. También pueden presentarse como lagos en regiones ricas en sales y minerales, en la haloclina y en lagunas costeras someras que funcionan como pozas de evaporación de agua de mar. Se clasifican de acuerdo a la composición iónica de su salmuera; cuando predominan sales y minerales provenientes del agua marina son llamados thalosalinos, mientras que si su origen fue a partir de evaporación de agua dulce (iones de magnesio y potasio) se denominan athalosalinos (Litchfield 1998).

Los ecosistemas hipersalinos han llamado la atención de la comunidad científica debido a que su origen data desde tiempos Precámbricos, por lo que su estudio permite entender su funcionamiento y contribución ecológica en nuestros tiempos y en el pasado geológico remoto (Javor 1989). Por otro lado, en estos ambientes, las únicas formas de vida que han sido capaces de sobrevivir a altas salinidades, son los microorganismos y sorprendentemente, en estos ecosistemas se ha encontrado una alta diversidad filogenética y funcional de microbios, por lo que son considerados entre los ecosistemas más diversos de nuestro planeta (Ley *et al.* 2006). Así, el estudio de estos ambientes extremos en salinidad es una

excelente opción para la bio-prospección de microorganismos con potencial biotecnológico (Margesin y Schinner 2001).

Los ambientes hipersalinos están distribuidos alrededor del mundo. En la Figura 1 se muestra un mapa donde se observan los ambientes hipersalinos más reconocidos en el mundo. Algunas localidades son identificadas como modelo de estudio debido a que son lugares con una alta estabilidad y conservación del ecosistema, tal es el caso de la salinera solar más grande de México, Exportadora de Sal, en Guerrero Negro, B.C.S. Esta localidad es identificada como uno de los mejores sitios para el estudio de los ambientes hipersalinos a nivel mundial debido a que en este lugar existen pozas de evaporación artificiales en un gradiente de salinidad de 4.5% a 28%, funcionando como un macro experimento a mega escala para el estudio de estos ecosistemas (Des Marais 2010).

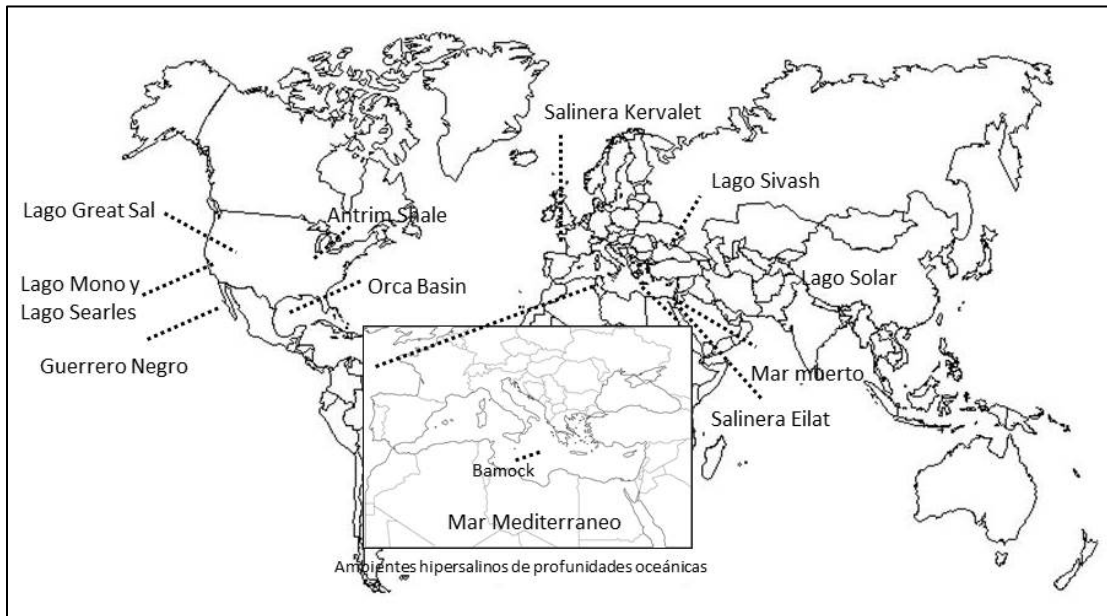


Figura 1: Localidades de ambientes hipersalinos reconocidos alrededor del mundo (McGenity 2010).

1.2 Tapetes microbianos de ambientes hipersalinos

Las comunidades microbianas que habitan los ambientes hipersalinos se desarrollan sobre el bentos secretando una matriz mucilaginosa extracelular de polisacáridos que los mantiene embebidos a los granos del sedimento, dando un aspecto de una alfombra sobre el suelo de milímetros a centímetros de espesor. Formalmente, a estas estructuras se les denomina tapetes microbianos (Gerdes 2007 y Chacon 2010). Los microorganismos que forman estas macroestructuras, se organizan espacialmente en estratos horizontales bien diferenciados, como consecuencia de su adaptación a la disponibilidad de la luz, tolerancia de oxígeno y sulfuros (Stal 1995 y Severin y Stal 2010). Además, otros factores como la temperatura ambiental, la disponibilidad del agua, concentración de sal y tamaño del grano del sedimento, son determinantes para el desarrollo óptimo de los tapetes microbianos (López-Cortés 1998).

1.2.1 Procesos microbianos en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos

Los tapetes microbianos son ecosistemas completos y autosustentables con una alta diversidad funcional de microbios autótrofos y heterótrofos. De hecho, se cree que en estas estructuras están presentes la mayoría, si no es que todos, los procesos biogeoquímicos que existen en los ecosistemas acuáticos (Ley *et al.* 2006 y Abed *et al.* 2015).

Los tapetes microbianos tienen un desarrollo en laminaciones horizontales, donde cada uno de los estratos posee una comunidad microbiana particular con un nicho trófico y ecológico distinto. De tal manera que, en unos pocos milímetros, interaccionan una gran cantidad de ciclos biogeoquímicos (Des Marais 1993, Gerdes 2007 y Chacon 2010). En la parte más superficial del tapete se ha reportado una alta actividad fotosintética originada por diatomeas y cianobacterias, principalmente. En la mayoría de los tapetes microbianos, las cianobacterias

llegan a constituir la mayor parte de la biomasa, por lo que contribuyen significativamente en la producción primaria y por lo tanto en la incorporación de materia orgánica. Además, durante las noches fijan nitrógeno atmosférico haciendo disponible este elemento dentro del tapete (Des Marais 2010 y Oren 2015).

Unos milímetros por debajo del tapete, donde no llega la luz, se ha encontrado actividad fotosintética en ausencia de oxígeno, por bacterias verde y púrpura del azufre, las cuales utilizan donadores de electrones alternos como lo son H₂, compuestos orgánicos o compuestos de azufre (Ollivier 1994). También, se lleva a cabo la degradación de la materia orgánica principalmente por fermentación, sulfato reducción y metanogénesis, dando como resultado una conspicua liberación de hidrógeno y CO₂ y una moderada, pero constante, liberación de metano (Des Marais 2003).

La coexistencia entre la metanogénesis y la sulfato reducción en ambientes hipersalinos ha llamado la atención de la comunidad científica debido a que en otros ecosistemas se ha encontrado que estos metabolismos presentan una fuerte competencia por los mismos sustratos, por lo cual son considerados como procesos metabólicos mutuamente excluyentes (Oremland y Polcin 1982 y King 1988). Pese a ello, ha sido documentado que en ecosistemas hipersalinos la producción de metano es abastecida por sustratos denominados “no competitivos” entre bacterias sulfato reductoras y metanógenas, tales como aminas metiladas, metanol y dimetil sulfuro (García-Maldonado 2012 y Kelley *et al.* 2015).

1.3 Competencia entre metanogénesis y sulfato reducción

La metanogénesis y la sulfato reducción son nichos tróficos terminales en la degradación de la materia orgánica (Oremland y King 1989), lo que significa que, para que se lleven a cabo estos procesos, primero participan una gran diversidad de microorganismos anaerobios en una serie de pasos previos.

Primero las macromoléculas como proteínas, carbohidratos y lípidos son hidrolizados en sus unidades elementales (aminoácidos, monómeros y ácidos grasos) por enzimas producidas por bacterias hidrolíticas. En una segunda fase, los compuestos hidrolizados son fermentados y transformados en ácidos grasos volátiles (acetato, butirato, propionato, lactato etc.) e hidrógeno en un proceso denominado acidogénesis (Bodelier y Steenberg 2014). Posteriormente, se lleva a cabo la acetogénesis, donde los ácidos grasos volátiles se convierten en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Luego, en presencia de sulfato, las bacterias sulfato reductoras utilizan estos productos. Cuando en el ecosistema el sulfato no está presente, estos sustratos son consumidos principalmente por microorganismos metanogénicos (Muyzer y Stams 2008, Fig. 2).

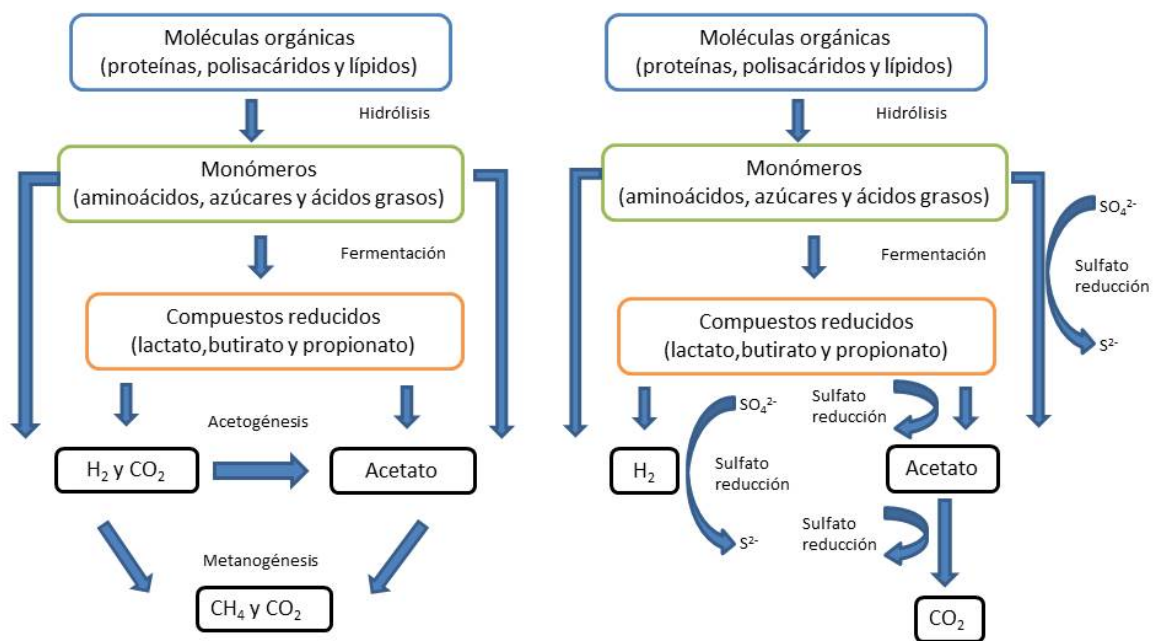


Figura 2: Degradación de la materia orgánica en presencia y ausencia de sulfato. Tomado de Muyzer y Stams (2008).

Los sustratos ecológicamente más comunes por los cuales compiten las bacterias sulfato reductoras y las arqueobacterias metanogénicas son el hidrógeno y el acetato, aunque se pueden incluir otros como el metanol. Esta exclusión metabólica se explica debido a que comparando el uso de los sustratos, la sulfato-

reducción es termodinámicamente más favorable sobre la metanogénesis (Tabla 1).

Tabla I: Reacciones y energías de reacción para la metanogénesis y la sulfato reducción utilizando distintos sustratos ecológicamente relevantes. (-) El lactato no es un sustrato para la metanogénesis. *Reacción propuesta en el presente trabajo. Se utiliza la forma protonada de la trimetilamina debido a que el pKa de dicho compuesto es de 9.8.

Sustrato/ Proceso	Metanogénesis		Sulfato reducción	
	Ecuación	ΔG° (kJ · mol ⁻¹)	Ecuación	ΔG° (kJ · mol ⁻¹)
Hidrógeno	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-33.9	$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-37.9
Acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
Lactato	-	-	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2^- + 0.5\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 0.5\text{HS}^-$	-80.2
Metanol	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-79	$4\text{CH}_3\text{OH} + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-91
Trimetilamina	$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-18.5	$*4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 9\text{SO}_4^{2-} + 9\text{H}^+ \rightarrow 12\text{CO}_2 + 9\text{HS}^- + 4\text{NH}_4^+ + 12\text{H}_2\text{O}$	-308.3

Pese a ello se ha encontrado que en aquellos ecosistemas donde se encuentran concentraciones importantes de sulfato, la metanogénesis puede existir utilizando sustratos alternos como metilaminas, metanol, y dimetil-sulfóxido (Oremland y King 1989, McGenity 2010, Oren 2011 y Kelley *et al.* 2015).

1.3.1 Metanogénesis y sulfato reducción en ambientes hipersalinos

La metanogénesis es un proceso estrictamente anaerobio, siendo el metano el producto principal del metabolismo microbiano. La fisiología de estos organismos está clasificada en tres rutas metabólicas principales: (1) hidrogenotróficos, los cuales metabolizan H_2 y CO_2 ; (2) acetoclásticos, que consumen acetato y (3) metilotróficos, quienes utilizan sustratos metilados (Laloui-Carpentier *et al.* 2006 y Whitman 2006). Todos los metanógenos conocidos pertenecen al phylum Euryarchaeota y actualmente se han propuesto 7 Ordenes: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanopyrales, Methanocellales y Methanomassiliicoccales (Liu 2010 y Borrel *et al.* 2013).

La producción de metano biogénico en ecosistemas hipersalinos ha sido ampliamente documentada. Estudios con análisis isotópicos así como incubaciones experimentales, han demostrado que la ruta metanogénica metilotrófica es predominante en estos ecosistemas (McGeniy 2010). Esto se explica porque, muy probablemente, las bacterias sulfato reductoras desplazan a las arqueobacterias metanogénicas por los sustratos hidrógeno y acetato. De hecho, en ambientes hipersalinos hasta la fecha sólo han sido reportados microorganismos metanogénicos metilotróficos pertenecientes al orden Methanosarcinales (McGeniy 2010, Oren 2011 y García-Maldonado *et al.* 2015).

La coexistencia de la metanogénesis y la sulfato reducción fue por primera vez reportada por Oremland y Polcin (1982). En su trabajo utiliza incubaciones de microcosmos de sedimentos estuarinos ricos en sulfato (salinidad 1.2% y sulfato ~10mM) para estimular ambos procesos metabólicos. Encuentra que los sustratos que más estimularon la producción de metano fueron la trimetilamina y el metanol, además estos sustratos no estimularon la producción de sulfuro, siendo así sustratos exclusivos para la metanogénesis. Adicionalmente, Oremland *et al.* (1982) detectaron que la metanogénesis y la sulfato reducción coexisten en

sedimentos marinos con concentraciones de salinidad y sulfato de 20‰ y 18 mM, respectivamente, encontrando de nuevo que los sustratos que más estimularon la metanogénesis fueron la trimetilamina y el metanol. Además, en experimentos donde la metanogénesis fue inhibida, encontró una acumulación tanto de trimetilamina como de metanol en las incubaciones, sugiriendo que estos sustratos no eran utilizados por otros microorganismos. De esta manera, estos sustratos, junto con otros sustratos metilados, han sido denominados como “no competitivos” entre las arqueobacterias metanogénicas y las bacterias sulfato reductoras (King 1988, Oremland y King 1989, McGenity 2010 y Kelley *et al.* 2015).

1.3.2 Trimetilamina y metanol como sustratos en ambientes hipersalinos

Diversos estudios han evidenciado que la trimetilamina y el metanol son sustratos ecológicamente relevantes en ambientes hipersalinos ya que juegan un papel central en la metanogénesis, contribuyendo con 55-92% y 8-40%, respectivamente, del metano total generado en estos ecosistemas (García-Maldonado *et al.* 2012 y Kelley *et al.* 2015). La trimetilamina es un compuesto abundante en ambientes acuáticos ya que se produce a partir de la descomposición de la materia orgánica de organismos marinos. Naturalmente se encuentra de forma gaseosa y posee un característico olor a putrefacción marina. Los principales precursores de la trimetilamina son el óxido de trimetilamina, la glicina betaína y la colina. Los dos primeros son importantes osmo-reguladores producidos por una gran cantidad de organismos que van desde microbios, peces y plantas. La colina es un componente importante en las membranas celulares que brinda estabilidad y resistencia (Oren 1990 y Welsh 2000). El metanol dentro del ecosistema es atribuido principalmente a la degradación de la pectina y lignina, los cuales son componentes principales de las paredes celulares de cianobacterias, algas y plantas. Así mismo, se ha encontrado que algunos organismos como el fitoplancton, diatomeas y cianobacterias, pueden producir metanol como metabolito secundario (Aicher y Mincer 2014).

Pese a que el metanol y la trimetilamina son considerados sustratos no competitivos entre la metanogénesis y la sulfato reducción en ambientes hipersalinos, existen reportes del uso de estos sustratos por bacterias sulfato reductoras en otros ecosistemas donde estos sustratos también son ecológicamente relevantes y se encuentran disponibles. Es bien conocido que en plantas de tratamiento de aguas residuales pueden existir bacterias sulfato reductoras que utilizan el metanol como fuente de energía. De hecho, la sulfato reducción, utilizando metanol como donador de electrones, es termodinámicamente más favorable que la metanogénesis utilizando el mismo sustrato (Tabla I). Diversos microorganismos sulfato reductores capaces de crecer con metanol como fuente de carbono han sido documentados y en la actualidad existen cultivos puros de estos microorganismos (Nanninga y Gottschal 1986, Liamleam y Annachatre 2007 y Muyzer y Stams 2008).

Con respecto a la trimetilamina, el único reporte del uso de este sustrato por bacterias sulfato reductoras fue realizado por King (1984). En dicho trabajo realiza enriquecimientos en microcosmos, adicionando trimetilamina como sustrato, y encuentra una importante producción de sulfuro de hidrógeno mayor a la de los controles sin sustrato. Además, en incubaciones donde la metanogénesis fue inhibida, encontró un decremento de trimetilamina de hasta 25% de la cantidad inicial suministrada, mostrando que este consumo del sustrato pudo haberse dirigido hacia sulfato reducción o incluso ser empleada por diferentes microorganismos.

Recientemente, no existen estudios enfocados a la competencia de sustratos por bacterias sulfato reductoras y arqueobacterias metanogénicas en ecosistemas hipersalinos. Pese a que han sido reportados microorganismos sulfato reductores capaces de utilizar los sustratos denominados “no competitivos” para la metanogénesis (trimetilamina y metanol) en otros ecosistemas donde estos sustratos son ecológicamente relevantes, actualmente se consideran a estos sustratos como exclusivos para la metanogénesis (Oren 1999, McGenety 2010 y Kelley *et al.* 2015).

La información sobre bacterias sulfato reductoras capaces de utilizar los sustratos denominados no competitivos es limitada, de esta manera el objetivo del presente trabajo es evaluar la competencia entre la metanogénesis y la sulfato reducción en ambientes hipersalinos, evaluando 5 diferentes sustratos ecológicamente relevantes: hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina.

Justificación

Aunque en la actualidad se consideran a la trimetilamina y el metanol como sustratos no competitivos para la metanogénesis (Oren 1999, McGenety 2010 y Kelley *et al.* 2015), existe una cantidad considerable de antecedentes donde describen a bacterias sulfato reductoras capaces de utilizar dichos sustratos (King 1984, Nanninga y Gottschal 1986, Liamleam y Annachatre 2007 y Muyzer y Stams 2008). Por ello, es necesario un conocimiento más profundo sobre la competencia entre ambas rutas metabólicas que representaría un flujo de energía previamente no considerado para el entendimiento de los ecosistemas hipersalinos. Por otro lado, los ambientes hipersalinos han sido descritos como uno de los ecosistemas con mayor diversidad funcional y filogenética de microorganismos (Ley *et al.* 2006, Gerdes 2010 y Chacon 2010), por lo que parecería inverosímil asegurar que existen “sustratos exclusivos” o “no competitivos” para un solo grupo microbiano. Así, resulta imprescindible cuestionar este paradigma si es que en realidad es posible que existan “sustratos no competitivos” en un ecosistema tan diverso como lo es el hipersalino. El presente trabajo aportará información para un mayor entendimiento sobre la contribución de cinco metabolitos de relevancia ecológica (hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina), como sustratos para los procesos de metanogénesis y sulfato reducción en ambientes hipersalinos, con ello, en el futuro se podrán hacer estimaciones más acertadas sobre los flujos de energía que prevalecen en estos ecosistemas y evaluar su potencial contribución a escala global.

2. Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivos

2.2 Objetivo General

Evaluar la contribución del hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina como sustratos para los procesos de metanogénesis y sulfato reducción en muestras de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos.

2.3 Objetivos particulares

Evaluar si los sustratos hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina pueden ser utilizados para la metanogénesis y sulfato reducción en muestras de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos.

Estudiar la competencia entre los procesos de metanogénesis y sulfato reducción por sustratos ecológicamente relevantes (hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina) en muestras de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos.

2. 4 Hipótesis

El proceso de la sulfato reducción prevalecerá sobre la metanogénesis, en el uso de los sustratos probados, hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina, debido a que termodinámicamente la reacción es más favorable.

Basado en principios termodinámicos, se postula que los sustratos denominados “no competitivos” para la metanogénesis (metanol y trimetilamina), pueden ser utilizados por bacterias sulfato reductoras, en ecosistemas donde estos sustratos son relevantes, como los ambientes hipersalinos.

3. Metodología

3.1 Trabajo de campo

En Febrero del 2015 se recolectaron muestras de tapetes microbianos en la salinera solar Exportadora de Sal, en Baja California Sur, México. La empresa está comprendida por una serie de pozas de evaporación interconectadas que toman el agua de mar de la Laguna Ojo de Liebre. Para la producción de sal el agua marina es bombeada a través de 13 estanques (denominados “Áreas”) donde se evapora el agua, promoviendo un gradiente creciente de concentración de sal que va desde 6-13%. El sitio seleccionado para el muestreo corresponde a Área 4, con concentraciones de salinidad y sulfato de 8.5% y 55mM respectivamente (Fig. 3). Se seleccionó esta localidad como sitio de estudio debido a que estas condiciones son óptimas para la vida halófila (Des Marais 2010 y Oren 2011).



Figura 3: Salinera solar Exportadora de Sal, Guerrero Negro, BCS, México. Se observan la serie de pozas de evaporación y su numeración. El punto rojo indica el sitio de muestreo en Área 4.

3.2 Trabajo experimental

Los tapetes microbianos recolectados de Área 4 fueron incubados en microcosmos. Se utilizaron viales serológicos de 120 ml previamente esterilizados para contener el cultivo en una atmósfera anaerobia. Las condiciones anaerobias se obtuvieron intercambiando las atmósferas de los microcosmos por N₂ (99.9%) y sellando los viales con tapones de caucho y con anillos de aluminio. Se utilizaron aproximadamente 3 g de inóculo de tapete microbiano, las incubaciones fueron hechas sin agitación y en obscuridad a 28°C durante un tiempo total de 58 días.

Para cada microcosmos se utilizaron 100 ml de salmuera artificial como medio basal conteniendo (g/L): NaCl (72.8), KCl (2), MgCl₂·6H₂O (29.33), CaCl₂·2H₂O (3), KBr (0.28), NaHCO₃ (0.21), Na₂SO₄ (9.94) (Bebout *et al.* 2004) y 1 ml/L de una solución de elementos traza (mg/L): FeCl₂·4H₂O (2,000), H₂BO₃ (50), ZnCl₂ (50), CuCl₂·6H₂O (90), CoCl₂·6H₂O (2000), NiCl₂·6H₂O (920), Na₂SeO₃·5H₂O (162), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (500), EDTA (1,000), Na₂WO₄·H₂O (100) y 1 mL de HCl al 36%. El pH final del medio de cultivo fue de 7.5.

Para evaluar la competencia entre bacterias sulfato reductoras y arqueobacterias metanogénicas, se evaluaron 5 diferentes sustratos potenciales para la estimulación de ambos procesos: hidrógeno, acetato, lactato, metanol y trimetilamina. Las incubaciones se realizaron por triplicado, utilizando los mismos equivalentes de electrones, en términos de demanda química de oxígeno (DQO), para todos los sustratos (0.976 g DQO/L). Para evaluar el uso de los sustratos para la sulfato reducción, para cada caso se montó un experimento control inhibiendo la metanogénesis con ácido bromoetanosulfónico (BES) a una concentración final de 50 mM.

Para cada experimento se adicionaron un total de 3 pulsos de cada sustrato a distintos tiempos (tiempo cero, día 20 y día 39) con la concentración inicial utilizada. Además para cada caso se consideró un control sin aceptor de

electrones (sulfato) (Tabla 2). Las concentraciones de salinidad y sulfato utilizadas fueron las originales de la localidad (8.5% y 55mM, respectivamente).

Tabla 2: Diseño experimental con los distintos sustratos evaluados. Para cada sustrato se consideró un tratamiento con sulfato (SO₄) y uno sin sulfato (wSO₄).

Localidad/Sustrato	Control sin sustrato		Hidrógeno		Lactato		Acetato		Metanol		Trimetilamina	
	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄
Área 4	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄
Área 4 + BES	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄	SO ₄	wSO ₄

3.3 Métodos analíticos

Las concentraciones de los gases producidos (metano e hidrógeno) en los experimentos fueron cuantificadas por cromatografía de gases (Agilent 6850 Series GC System) con detector de conductividad térmica a 250°C, equipado con una columna empacada (HAYESEP D 100/120 de 10' x 1/8" x 0.085" SS) a 250°C, utilizando nitrógeno como gas acarreador. Todas las muestras fueron directamente inyectadas al cromatógrafo (100 µL) sin previa preparación.

La producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) fue cuantificada regularmente a través del método colorimétrico de cobre-sulfato (Cord-Ruwisch 1985). Además, se cuantificó el amonio producido en los experimentos de trimetilamina, utilizando la técnica colorimétrica de fenol-hipoclorito, descrita en *Standard Methods* (Eaton *et al.* 1998). Para determinar diferencias significativas sobre la producción de metano y H₂S entre el control y las condiciones manipuladas, se llevó a cabo análisis de varianza de una vía y una prueba *a posteriori* Tukey.

4 Resultados

4.1 Incubaciones con hidrógeno

Los experimentos con hidrógeno mostraron actividad sulfato reductora hasta el segundo pulso de sustrato (día 19). En total, se observó una producción entre 12-14 mM de H_2S a lo largo de 58 días de incubación (Fig. 4), con una tasa respiratoria máxima de 0.94 mmol por gramo de sedimento por día (mmol/gsed – d) (Tabla 3). Además, el balance energético al final del experimento, mostró que aproximadamente 25% del hidrógeno adicionado derivó en sulfato reducción (Tabla 4). No se detectó la producción de metano e hidrógeno en estas incubaciones, mientras que en los experimentos adicionados con BES, no se detectó actividad sulfato-reductora ni metanogénica.

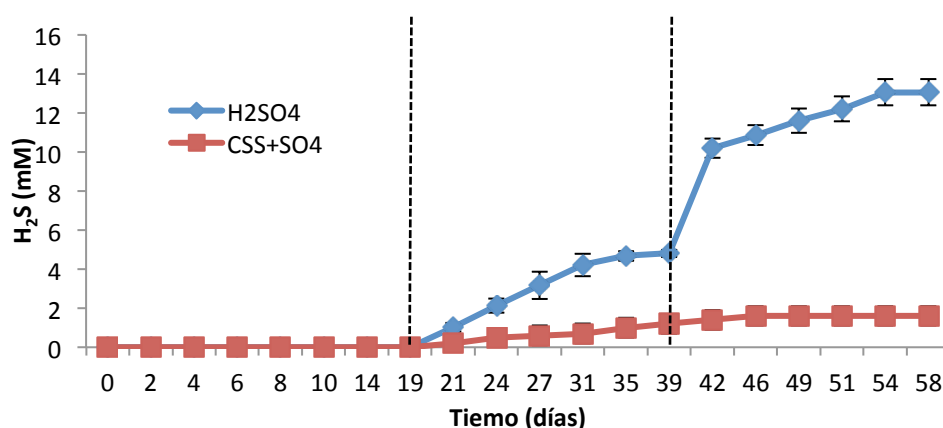


Figura 4: Producción de sulfuro de hidrógeno en los enriquecimientos con hidrógeno (H_2SO_4). Control sin sustrato ($CSS+SO_4$). Las líneas verticales punteadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

4.2 Incubaciones con lactato

En los enriquecimientos con lactato, sin el inhibidor metanogénico BES, se detectó actividad sulfato reductora desde el primer pulso de sustrato, obteniendo un rango

de producción entre 35-40 mM de H_2S (Fig. 5a), con una tasa respiratoria máxima de 2.57 mmol/gsed $-d$ (Tabla 3) Con ello, el balance energético mostró que el 84% del sustrato adicionado derivó en sulfato reducción (Tabla 4). También, se detectó una producción de gas hidrógeno a partir del día de incubación 21, alcanzando una acumulación total de 0.35 mM de H_2 (Fig. 5b).

Por su parte, en los tratamientos endógenos sin sulfato como aceptor de electrones, se encontró una acumulación máxima de 0.74 mM de H_2 a los 46 días de incubación, la cual disminuyó progresivamente con el tiempo hasta llegar a 0.35 mM de H_2 .

Destacadamente, en la etapa final de estos experimentos, se registró producción de metano a partir del día 46, con una acumulación total de 2.50-2.9 mM de CH_4 al final de la incubación (Fig. 5b).

En contraste, los experimentos con el inhibidor BES adicionado, mostraron una escasa actividad sulfato reductora, con acumulación total de hasta 15 mM de H_2S (Fig. 5c). Respecto a la producción de gases, en los experimentos sin sulfato como aceptor de electrones, se detectó una acumulación de hidrógeno máxima al día 42 con 2.1 mM de H_2 . Posterior a este día, la concentración de este gas en el espacio de cabeza disminuyó hasta llegar a ~ 0.5 mM de H_2 (Fig. 5d).

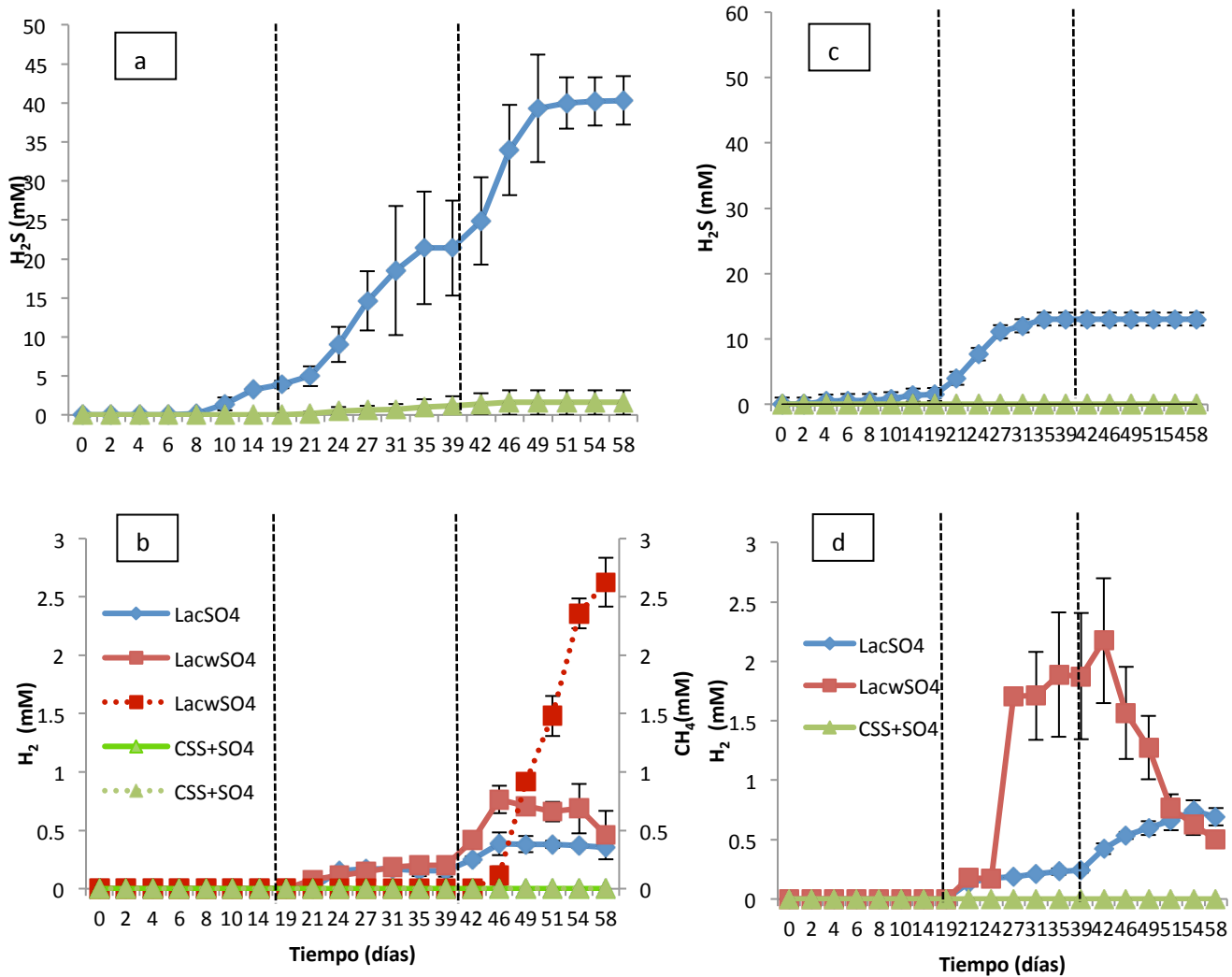


Figura 5: Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos con lactato. a) producción de sulfuro de hidrógeno en experimentos sin el inhibidor BES; b) producción de hidrógeno y metano en experimentos sin inhibidor BES (líneas discontinuas en eje secundario corresponden a la producción de metano); c) producción de sulfuro de hidrógeno en experimentos con el inhibidor BES; d) producción de hidrógeno en experimentos con el inhibidor BES. Lactato y sulfato (LacSO4), lactato sin sulfato (LacwSO4), control sin sustrato (CSS+SO4). Las líneas verticales punteadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

4.3 Incubaciones con acetato

La producción de H_2S en las incubaciones con acetato, ocurrió principalmente durante los primeros 24 días de incubación, alcanzando hasta 31 mM de H_2S . En estos experimentos, se registró la tasa de actividad sulfato reductora más alta con 5.88 mmol/gsed $-d$ (Tabla 3) con un balance del uso de sustrato por este proceso de hasta 70% (Tabla 4). Posterior al día 24, se observó una potencial inhibición de la sulfato reducción, produciendo 35-38 mM de H_2S a lo largo de 58 días de incubación (Fig. 6a).

Destacadamente, sólo en los experimentos endógenos con acetato sin sulfato en el medio, se detectó una acumulación de metano de hasta 1.7 mM de CH_4 . Esto ocurrió durante una etapa tardía de la incubación a partir del tercer pulso de sustrato (Fig. 6b). Por otro lado, en los experimentos adicionados con el inhibidor BES, no se detectó actividad metanogénica ni sulfato reductora.

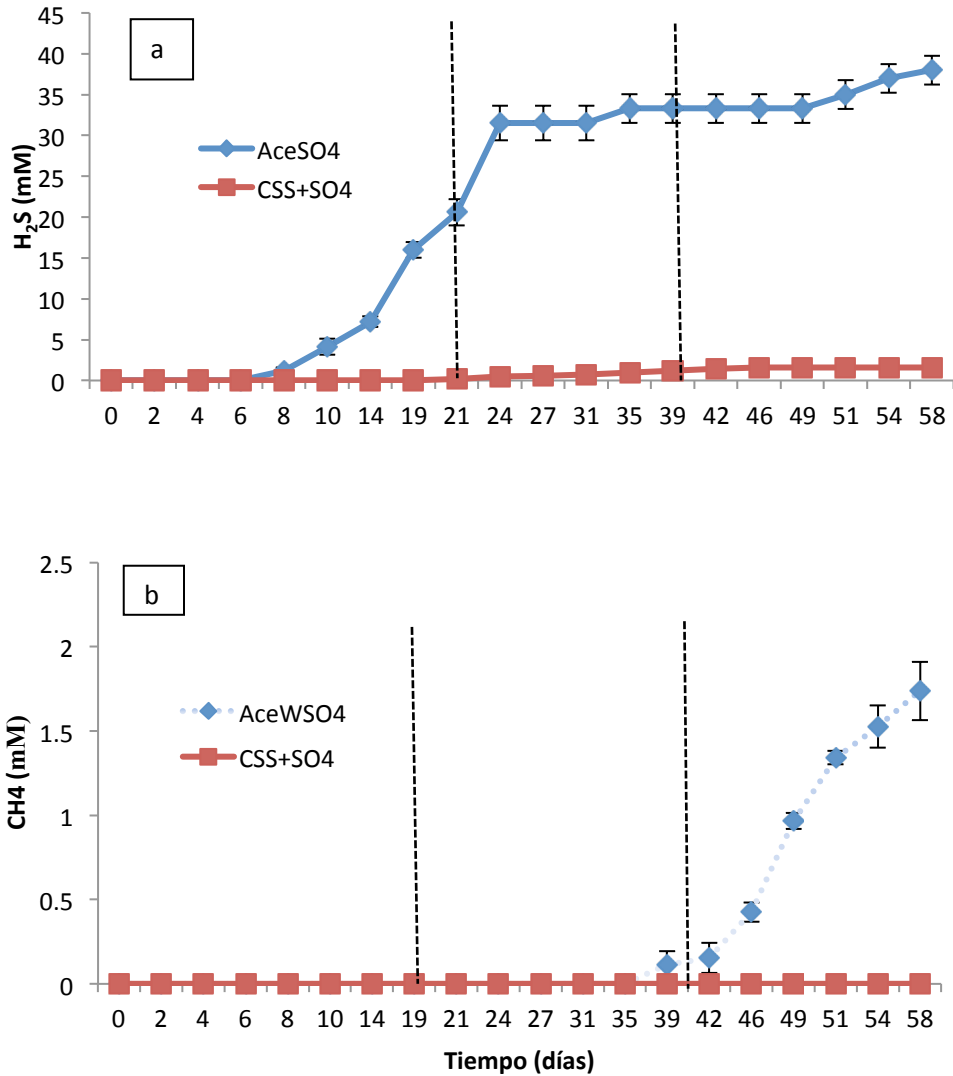


Figura 6: Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos de acetato. a) producción de sulfuro de hidrógeno; b) producción de metano. Acetato y sulfato (AceSO4), acetato sin sulfato (AceWSO4), control sin sustrato (CSS+SO4). Las líneas verticales punteadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

4.4 Incubaciones con metanol

En los microcosmos con metanol como donador de electrones se detectó actividad sulfato reductora desde el primer pulso de sustrato, resultando en una acumulación de hasta 6mM de H₂S al final de la incubación (Fig. 7a), con un tasa de actividad máxima de 0.28 mmol/gsed -d (Tabla 3) y un uso del sustrato por este proceso de ~10% (Tabla 4). Así mismo, este sustrato mostró ser un eficiente precursor metanogénico, ya que desde el primer pulso de sustrato se detectó producción de metano, alcanzando hasta ~10 mM de CH₄ en ambos experimentos con y sin sulfato como aceptor de electrones (Fig. 7b), representando un uso del sustrato de hasta 23% por metanogénesis (Tabla 4). En tanto a los experimentos adicionados con BES, no mostraron actividad sulfato-reductora ni metanogénica.

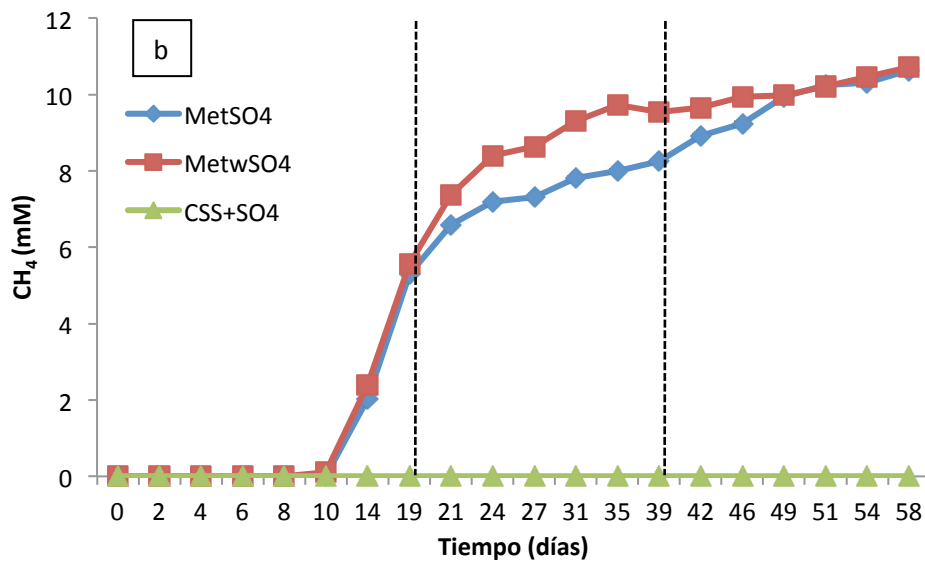
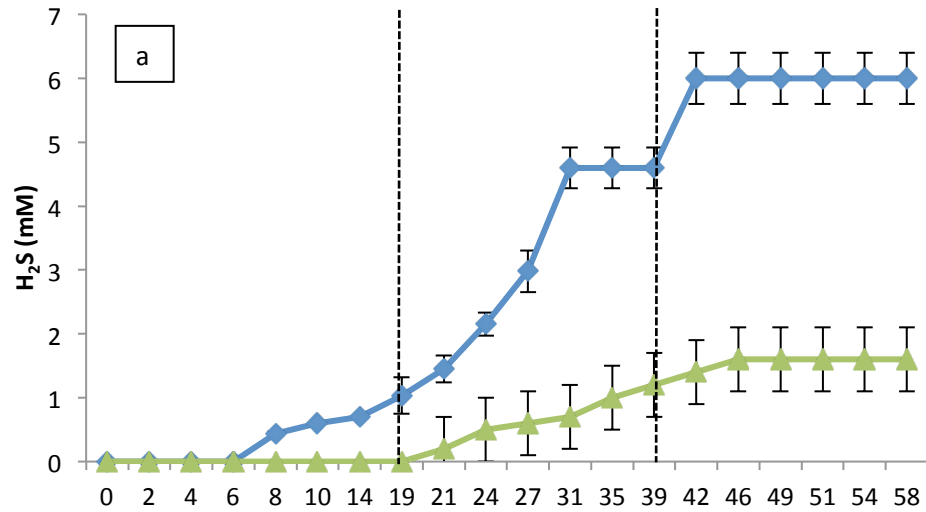


Figura 7: Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos con metanol. a) producción de sulfuro de hidrógeno; b) producción de metano. Metanol y sulfato (MetSO₄), metanol sin sulfato (MetwSO₄), control sin sustrato (CSS+SO₄). Las líneas verticales punteadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

4.5 Incubaciones con trimetilamina

Los enriquecimientos con trimetilamina como sustrato mostraron actividad sulfato reductora y metanogénica. La producción de H_2S comenzó desde el primer pulso de sustrato, con un total de 8.7 mM de H_2S durante el periodo de incubación (Fig. 8a), con un balance de uso de sustrato de 15.6% por este proceso (Tabla 4). Además, la tasa respiratoria máxima ocurrió durante el tercer pulso de sustrato con 0.531 mmol/gsed $-d$ (Tabla 3).

Por otro lado, se detectó actividad metanogénica en ambos experimentos con y sin sulfato desde la etapa final del primer pulso de sustrato, alcanzando en ambos casos hasta 12 mM de CH_4 (Fig. 8b) al final del tiempo de incubación, con un uso del sustrato del 17.6% por metanogénesis (Tabla 4)

Por su parte, la concentración de amonio comenzó a ser cuantificable a partir del segundo pulso de sustrato (día 19), registrando una acumulación de hasta 310 mg $N-NH_4$ al final del experimento (Fig. 9), lo cual representa un 44% de la trimetilamina total adicionada. De nueva cuenta, los experimentos adicionados con BES no mostraron actividad sulfato-reductora ni metanogénica.

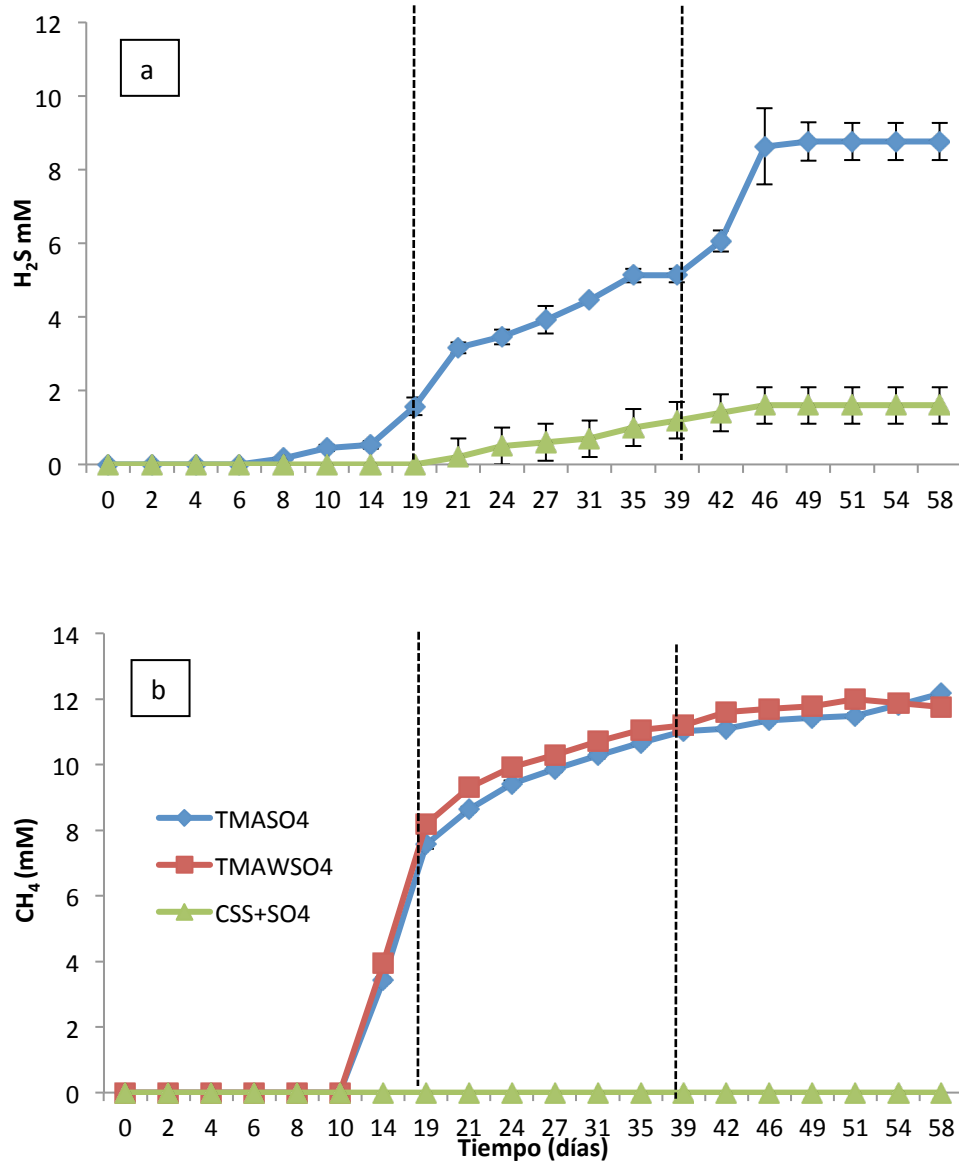


Figura 8: Metanogénesis y sulfato reducción en enriquecimientos con trimetilamina. a) producción de sulfuro de hidrógeno; b) producción de metano. Trimetilamina y sulfato (TMAwSO4), trimetilamina sin sulfato (TMAwSO4), control sin sustrato (CSS+SO4). Las líneas verticales punteadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

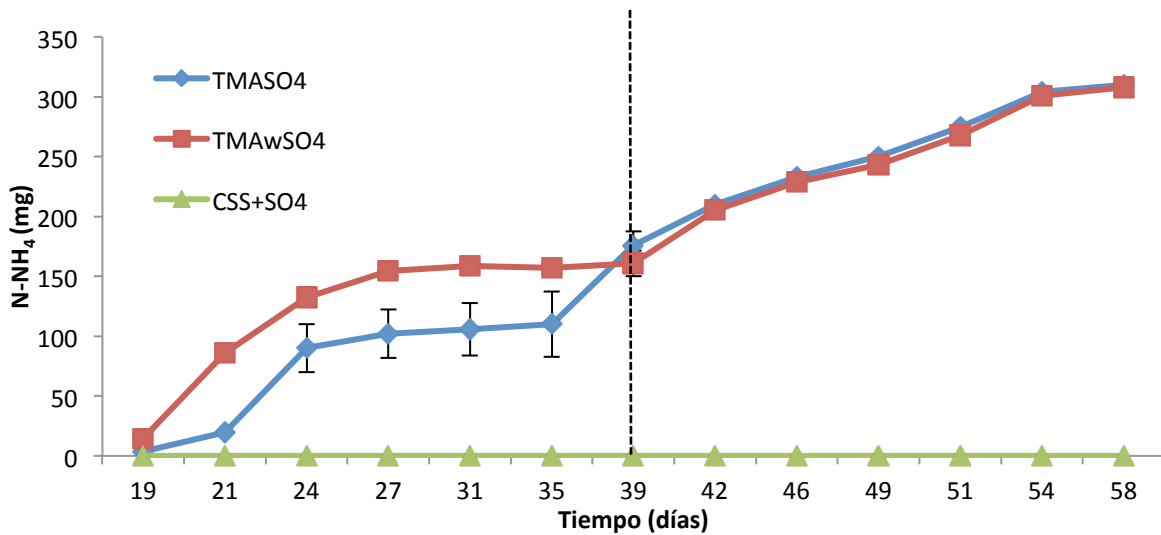


Figura 9: Producción de amonio (mg N-NH₄) en experimentos de trimetilamina. Trimetilamina y sulfato (TMASO₄), trimetilamina sin sulfato (TMAwSO₄), control sin sustrato (CSS+SO₄). La línea vertical punteada muestra el día en que se suministró pulso adicional de sustrato.

4.6 Comparación de procesos sulfato-reductores

Se evaluaron 5 potenciales sustratos para estimular la sulfato reducción en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos: hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina. Todos los sustratos mostraron una producción total de H₂S estadísticamente diferente al control sin sustrato ($P < 0.005$), siendo el lactato y el acetato los sustratos que más estimularon la sulfato reducción, con tasas respiratorias de 5.88 y 2.57 mmol/gsed $-d$ respectivamente. (Tabla 3). Posteriormente, el sustrato que más promovió la producción de H₂S fue el hidrógeno, seguido de la trimetilamina y el metanol (Fig. 10).

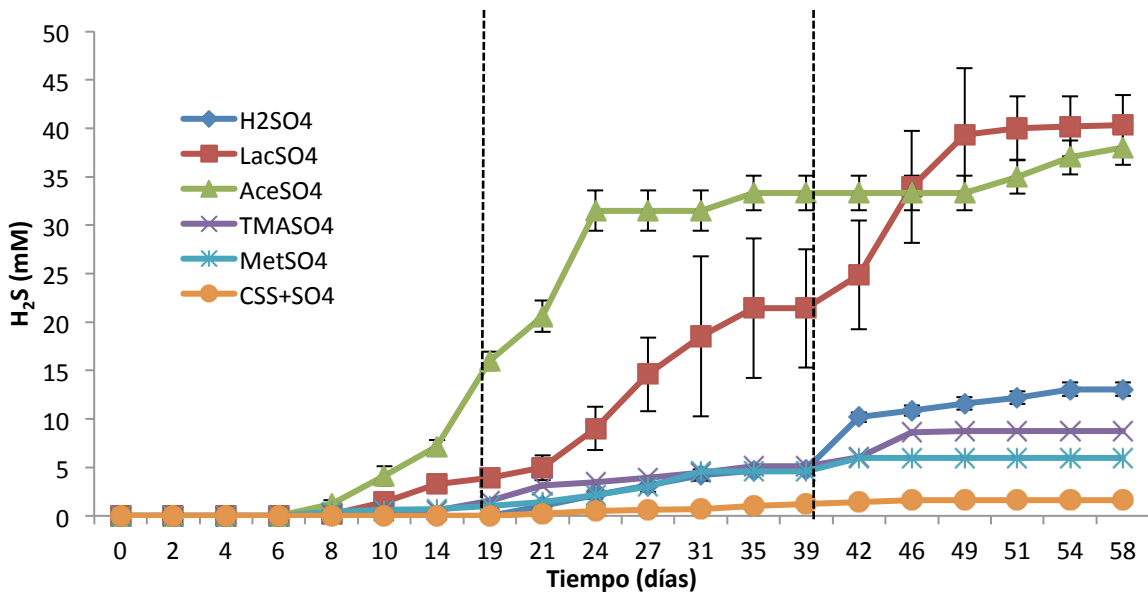


Figura 10: Uso de sustratos para la sulfato reducción. Producción de sulfuro de hidrógeno (mM) en enriquecimientos con hidrógeno (H2SO4), lactato (LacSO4), acetato (AceSO4), trimetilamina (TMAO4), metanol (MetSO4) y control sin sustrato (CSS+SO4). Las líneas verticales punteadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

Tabla 3: Tasas respiratorias máximas sulfato reductoras y metanogénicas utilizando distintos sustratos en muestras de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos. ND= no detectada.

Sustrato/Proceso	Metanogénesis		Sulfato reducción
	Tasas respiratorias (mmol/gsed -d)		Tasas respiratorias (mmol/gsed -d)
	Experimentos con sulfato	Experimentos sin sulfato	Experimentos con sulfato
Hidrógeno	ND	ND	0.94
Acetato	ND	0.16	5.88
Lactato	ND	0.19	2.57
Metanol	0.92	0.88	0.28
Trimetilamina	1.09	0.97	0.53

4.7 Comparación de procesos metanogénicos

De la misma manera, se probaron los mismos sustratos para estimular la metanogénesis en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos. Entre todos los experimentos, el único en el que no se detectó producción de metano fue en el enriquecimiento con hidrógeno, destacando que en las incubaciones con lactato y acetato, la producción de metano sólo ocurrió cuando el sulfato fue retirado del medio (Fig. 11).

Los sustratos preferentes para la metanogénesis fueron trimetilamina y metanol con tasas respiratorias de 1.09 y 0.92 mmol/gsed -d respectivamente (Tabla 3). Además, con dichos sustratos se estimuló la producción de metano en etapas

tempranas de la incubación, aún en ausencia de sulfato en el medio, con tasas de actividad similares (Tabla 3).

En las incubaciones con lactato y acetato, se detectó producción de metano sólo en los experimentos sin sulfato, con tasas respiratorias de 0.19 y 0.16 mmol/gsed $-d$, respectivamente (Fig. 11 y Tabla 3). Esto se presentó hasta el tercer pulso de sustrato durante una etapa tardía de la incubación (Fig. 11).

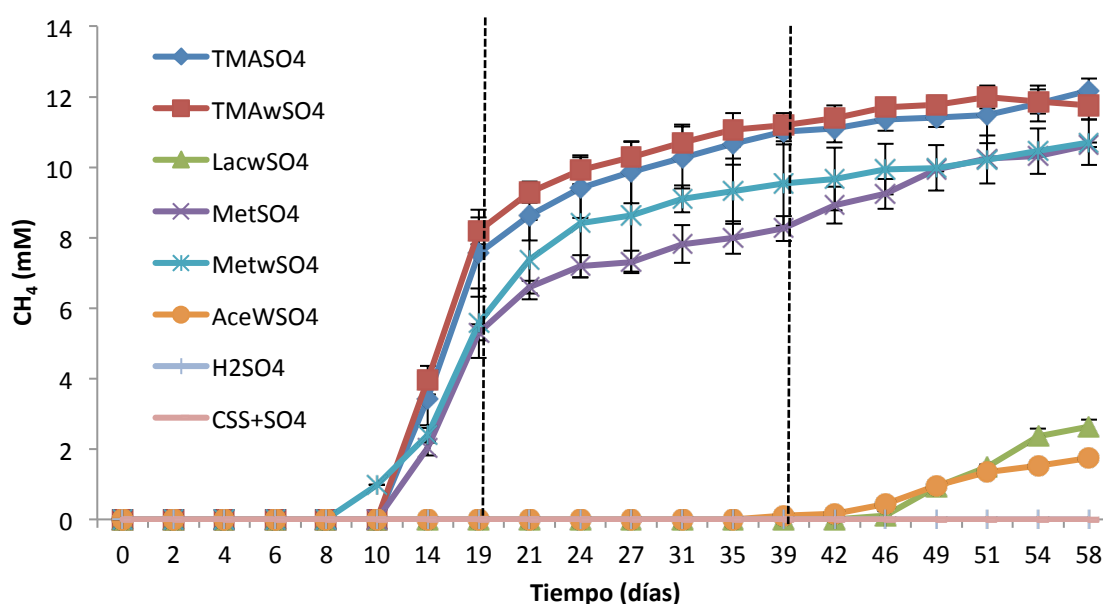


Figura 11: Uso de sustratos para la metanogénesis. Producción de metano (mM) en enriquecimientos de trimetilamina (TMAwSO₄), trimetilamina sin sulfato (TMAwSO₄), metanol (MetSO₄), metanol sin sulfato (MetwSO₄), lactato sin sulfato (LacwSO₄), acetato sin sulfato (AcewSO₄), hidrógeno (H₂SO₄) y control sin sustrato (CSS+SO₄). Las líneas verticales puntuadas muestran los días en que se suministraron pulsos adicionales de sustrato.

El balance energético al final del experimento mostró que los sustratos que más derivaron en el producto de la sulfato reducción fueron el lactato y el acetato, con un uso de hasta el 84% y 70% respectivamente. Para la metanogénesis, los

principales precursores mostraron ser la trimetilamina y el metanol con 17 y 22% cada uno.

Tabla 4: Balance de DQO (expresado en mg DQO/L) del uso de distintos sustratos por tapetes microbianos hipersalinos después de 58 días de incubación. ND = no detectado. Balance= (productos identificados- DQO endógeno)/ (DQO suministrado).

Tratamiento/ Producto	Metano	Sulfuro de Hidrógeno	Hidrógeno	Amonio	Balance (%)
Hidrógeno	ND	733.77	ND	ND	25
Acetato	ND	2082.8	ND	ND	70.3
Acetato sin sulfato	11	ND	ND	ND	0.3
Lactato	ND	2476	608	ND	84
Lactato sin sulfato	16	ND	ND	ND	0.5
Metanol	674	281.6	ND	ND	32.5
Trimetilamina	500	458.24	ND	310	87

5. Discusión

5.1 Incubaciones con hidrógeno

Diversos estudios en tapetes microbianos hipersalinos han mostrado que en estos ecosistemas el hidrógeno juega un papel central dentro de los metabolismos microbianos (Ollivier 1994). Altos flujos de hidrógeno y una producción neta sustancial de este gas durante periodos de oscuridad, han sido ampliamente

documentados en estos ambientes, sugiriendo que la participación de los tapetes microbianos en el flujo del hidrógeno, ha impactado la evolución de la atmósfera terrestre durante millones de años (Hoehler *et al.* 2001, Burow *et al.* 2012, Burow *et al.* 2014, Lee *et al.* 2014 y Hoffman *et al.* 2015). Por ello, la ecología del ciclo del hidrógeno en estos ecosistemas continúa siendo investigada.

En el presente trabajo se encontró que el hidrógeno es un potencial sustrato para la sulfato reducción. La actividad sulfato-reductora hidrogenotrófica ha sido escasamente investigada en ecosistemas hipersalinos. El único caso reportado es el de Burow *et al.* (2014), quienes realizan enriquecimientos de microcosmos adicionados con hidrógeno e inhibiendo la sulfato reducción y encuentra un incremento significativo en el eflujo del hidrógeno, sugiriendo así que las bacterias sulfato reductoras representan importantes hidrogenótrofos dentro de los tapetes microbianos de la Bahía Monterey, California. En su trabajo, reportan microorganismos pertenecientes a los Desulfobacterales como los principales consumidores de hidrógeno, con una producción de sulfuro durante periodos de oscuridad.

El balance energético al final de nuestro experimento mostró que el 25% del hidrógeno proporcionado derivó en el producto de la sulfato reducción (Tabla 4). Este porcentaje es sustancialmente mayor al reportado en sedimentos marinos que oscila entre 5-10% (Sorensen *et al.* 1981). Es bien conocido que el flujo del hidrógeno juega un rol importante en la formación de las comunidades microbianas y basado en el potencial redox, este gas representa un sustrato importante para una amplia variedad de procesos metabólicos anaerobios (Olliver 1994, Hoehler *et al.* 2001 y Burow *et al.* 2014). Evidencia isotópica sugiere que, en particular, microorganismos homoacetogénicos podrían contribuir significativamente en el consumo de hidrógeno dentro de estos ecosistemas (Kelley *et al.* 2006 y Oren 2011), por lo que consideramos que este metabolismo podría estar ocurriendo en nuestros microcosmos. Investigaciones más profundas con métodos de biología molecular son necesarias para elucidar la diversidad

microbiana predominante dentro de estos microcosmos y así identificar otros miembros hidrogenotróficos que están contribuyendo en el ciclo del hidrógeno dentro de estos ecosistemas.

Por otro lado, los enriquecimientos de hidrógeno no mostraron actividad metanogénica. Lo cual concuerda con estudios previos que han demostrado la ausencia de metanogénesis hidrogenotrófica en ambientes hipersalinos (McGenity 2010, Oren 2011 y García-Maldonado *et al.* 2012). Es bien conocido que la metanogénesis se encuentra en competencia con la sulfato reducción por los productos de fermentación hidrógeno y acetato. Además, dado que los ambientes hipersalinos se caracterizan por poseer concentraciones importantes de sulfato, la disponibilidad y afinidad por este aceptor de electrones favorece la sulfato reducción desplazando a la metanogénesis (Oremland y Polcin 1982, Oremland *et al.* 1982 y King 1989). Recientemente han sido reportados metanógenos potencialmente hidrogenotróficos en tapetes microbianos en Guerrero Negro B.C.S, a salinidades de 6.5% (Área 1) (García-Maldonado *et al.* 2015); sin embargo, no existe evidencia contundente de que estos microorganismos persistan en altas salinidades dentro de la misma localidad (Smith *et al.* 2008), lo que representaría uno de los limitantes biológicos para esta actividad.

5.2 Incubaciones con lactato

El lactato es uno de los principales productos de la acidogénesis durante la degradación de la materia orgánica. En ambientes hipersalinos es producido principalmente por la degradación del glicerol, el cual es un compuesto osmoregulador común y abundante en estos ecosistemas (Oren y Gurevich 1994).

El lactato ha sido descrito como uno de los donadores de electrones preferido por bacterias sulfato reductoras y un amplio espectro de estos microorganismos son capaces de crecer con esta fuente de energía (Liamleam y Annachhatre 2007 y Muyzer y Stams 2008). El balance energético mostró que el 84% de este sustrato

derivó en sulfato reducción. En este sentido, una gran diversidad de microorganismos sulfato reductores, halófilos, oxidadores completos e incompletos de lactato, han sido reportados (Oren, 1999 y Oren 2011). Teske *et al.* (1998) describen las comunidades de bacterias sulfato reductoras en Solar Lake, Egipto, y encuentra que los microorganismos capaces de utilizar lactato se encuentran en densidades poblaciones similares a distintas profundidades de los tapetes microbianos, sugiriendo así que este sustrato representa una importante fuente de carbono en estos ecosistemas.

Paralelamente, en las incubaciones adicionadas con lactato, se detectó producción de gas hidrógeno en ambos experimentos con y sin sulfato como aceptor de electrones (Figura 5b). Diversos estudios han mostrado que en tapetes microbianos hipersalinos, las cianobacterias constituyen el principal grupo de hidrogenógenos (Hoehler *et al.* 2001, Burow *et al.* 2012, Lee *et al.* 2014 y Hoffman *et al.* 2015). Es bien conocido que las cianobacterias son capaces de producir hidrógeno como subproducto de la fermentación de sus propias reservas energéticas de carbono almacenadas durante la fotosíntesis así como durante la fijación de nitrógeno (Bothe *et al.* 2010 y Oren 2015). Burow *et al.* (2012) realizan un estudio sobre el ciclo del hidrógeno en tapetes microbianos de la bahía Monterey, California y a través de evidencia biogeoquímica y molecular, determinan que la contribución de otros microorganismos diferentes a las cianobacterias, en la producción de hidrógeno, es probablemente mínima.

5.3 Incubaciones con acetato

El acetato es un intermediario común en la degradación de la materia orgánica. Esta fuente de carbono funciona como donador de electrones y suele acumularse en el ecosistema en ausencia de aceptores de electrones con alto potencial reductor, como el nitrato o iones de hierro. De esta manera, la oxidación anaerobia de acetato, con aceptores de electrones con bajo potencial reductor, como los

compuestos sulfurados, representa un importante flujo de energía que liga el ciclo del carbono y el azufre (Sorokin *et al.* 2016).

En los enriquecimientos de acetato se encontró súbita producción de H₂S durante los primeros 24 días de incubación, registrando la tasa de actividad sulfato reductora más alta entre todos los sustratos probados. El acetato ha sido reportado como el principal sustrato para la sulfato reducción en sedimentos hipersalinos. Skyring (1988) realizó un estudio en el Lago Eliza, Australia y encontró que entre el 85-90% del acetato mineralizado fue utilizado por bacterias sulfato reductoras.

Cabe señalar que, después de 24 días de incubación, la actividad sulfato reductora acetoclástica se detuvo (Fig. 6a) y mostró una aparente inhibición con las concentraciones de acetato utilizadas (3 pulsos de 0.976 gDQO/L equivalentes a 52.2 mM). En este respecto, Koschorreck *et al.* (2004) reporta en un bioreactor de aguas residuales, una inhibición de la actividad sulfato reductora con concentraciones de acetato encima de 15 mM, aunque no especifica los mecanismos de la inhibición. Adicionalmente, las bacterias sulfato reductoras acetoclásticas han sido reportadas como más susceptibles a inhibición por sulfuro que otros grupos de microorganismos sulfato reductores (Maillacheruvu y Parkin 1996 y Koschorreck *et al.* 2004).

En los experimentos endógenos de acetato, sin sulfato como aceptor de electrones, se detectó una producción de metano durante la etapa tardía de la incubación. La actividad metanogénica acetoclástica no ha sido previamente registrada en ecosistemas hipersalinos. El actual límite de tolerancia de salinidad reportado para metanógenos acetoclásticos es de 6% (Oren 2011). Potter *et al.* (2009) a través de análisis isotópicos sobre el metano biogénico generado en tapetes microbianos de Guerrero Negro, BCS, encuentra un cambio en la ruta metabólica metanogénica predominante a través de un gradiente de salinidad, reportando que a salinidades de 12% (Área 6) la ruta metanogénica metilotrónica

deja de ser dominante; sin embargo en su trabajo le no es posible distinguir si el novedoso sustrato para la metanogénesis es el acetato o el dimetil sulfuro.

La actividad metanogénica acetoclástica se detectó exclusivamente en los enriquecimientos con acetato sin sulfato como aceptor de electrones. Se ha reportado que la riqueza bacteriana disminuye conforme las condiciones del ecosistema son más energéticamente demandantes (Rothrock y García-Pichel 2005), de esta manera al anular el sulfato de los experimentos con acetato, no sólo se elimina la competencia del acetato por bacterias sulfato reductoras, sino que además se disminuye el estrés osmótico que el sulfato genera en estos ambientes, permitiendo la proliferación de bacterias menos abundantes en el ecosistema. En este sentido, se ha encontrado que microorganismos del Orden Halobacteriales y del Filo Chloroflexi son importantes participantes en el consumo del acetato en ambientes hipersalinos (Oren 1995, Oren 2006 y Lee *et al.* 2014) y más recientemente han sido reportados novedosos linajes de microorganismos halófilos dependientes de acetato (Sorokin *et al.* 2016). Por ello, es necesario realizar investigaciones más detalladas sobre la diversidad microbiana predominante en estos experimentos para conocer los cambios en la estructura de la comunidad, generados por la adición de este sustrato y así entender a mayor profundidad el papel del acetato en estos ecosistemas.

5.4 Incubaciones con metanol

Los alcoholes volátiles, como el metanol y el etanol, son importantes metabolitos en ambientes salinos. Bajo condiciones aerobias y anaerobias, el metanol puede ser producido por la descomposición de la lignina o pectina (Schink y Zeikus 1980). Diversos microorganismos como *Clostridium*, *Erwinia* y *Pseudomonas* han sido reportados como principales productores de metanol en ambientes anóxicos a través de la degradación de la pectina (Schink y Zeikus 1982).

Los resultados obtenidos mostraron que el metanol es un sustrato potencial para la sulfato reducción. Diversos microorganismos sulfato reductores que utilizan el metanol como fuente de energía han sido reportados y aislados de efluentes de plantas de tratamiento de aguas (Nanninga y Gottschal 1986, Liamleam y Annachatre 2007 y Muyzer y Stams 2008); no obstante, el uso del metanol por bacterias sulfato reductoras en ambientes hipersalinos ha sido escasamente estudiado. Kjeldsen *et al.* 2007 realizaron enriquecimientos selectivos de bacterias sulfato reductoras de Great Salt Lake, Utah y en incubaciones adicionadas con metanol describen microorganismos pertenecientes al Orden Desulfovibrionales y Desulfobacterales. Adicionalmente, algunos microorganismos metilotróficos halófilos han sido caracterizados (Tambekar *et al.* 2016 y Zhilina y Zavarzin 1990); sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no existe un estudio que esté dirigido a elucidar el papel del metanol en ecosistemas hipersalinos. Así, resulta imprescindible caracterizar a los microorganismos habitantes en estos enriquecimientos para conocer a mayor profundidad cuál es el destino del metanol dentro de estos ambientes y la diversidad microbiana asociada a este sustrato.

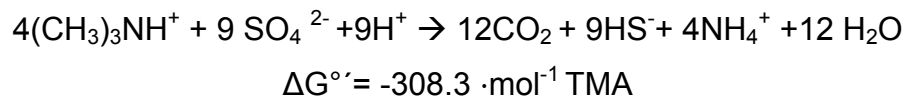
5.5 Incubaciones con trimetilamina

Una gran serie de estudios han mostrado la importancia de la trimetilamina en ambientes hipersalinos (King 1989 y Oren 1990). Este compuesto orgánico representa el principal precursor metanogénico en estos ecosistemas y en la actualidad se considera a este sustrato como exclusivo para la metanogénesis (McGenity 2010 y Kelley *et al.* 2015).

Las incubaciones con trimetilamina mostraron una producción de H₂S estadísticamente mayor a los controles sin sustrato. Esta evidencia sugiere que este compuesto estimuló directa o indirectamente la sulfato reducción. El único reporte previo sobre bacterias sulfato reductoras capaces de utilizar trimetilamina como sustrato fue realizado por King (1984), sin embargo en su trabajo no

describe a los microorganismos que llevan a cabo dicho proceso ni los mecanismos de reacción.

Nosotros proponemos la siguiente ecuación como un potencial mecanismo de reacción del uso de trimetilamina por bacterias sulfato reductoras:



Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran evidencia que sugiere un potencial uso de la trimetilamina por sulfato reducción, sin embargo, para corroborar dicho hallazgo es necesario obtener mayor información a través de múltiples estrategias, tales como amplificaciones de genes funcionales de sulfato reducción (*drsA/B* ó *Hyd*) a partir de ARN, uso de carbono isotópico marcado y visualización de los consorcios a través de técnicas de biología molecular como FISH. Con ello, se podrá esclarecer con mayor precisión si realmente existe competencia por este sustrato en ambientes hipersalinos entre bacterias sulfato reductoras y arqueobacterias metanogénicas.

Por otro lado, pese a que toda la discusión histórica se centra en la competencia de la trimetilamina entre bacterias sulfato reductoras y arqueobacterias metanogénicas, no han sido considerados otros organismos miembros del ecosistema que podrían ser capaces de utilizar la trimetilamina como sustrato y con los cuales también podría existir competencia. En este sentido, distintos microorganismos halófilos han sido reportados como capaces de crecer utilizando trimetilamina. Colby y Zatman (1973) reportan 12 cepas de microorganismos que utilizan este sustrato como fuente de carbono en donde destacan bacterias metilotróficas pertenecientes a los Géneros *Arthrobacter* y *Pseudomonas*. Meiber y Harder (1978) describe el metabolismo aerobio y anaerobio de la degradación de trimetilamina por una cepa de *Hyphomicrobium*. Así mismo, han sido reportados novedosos microorganismos desnitrificantes halófilos, pertenecientes al género

Paracoccus, que metabolizan trimetilamina de manera aerobia y anaerobia (Song-Gun *et al.* 2001 y Song-Gun *et al.* 2003). Evidentemente, el consumo de trimetilamina por otros microorganismos diferentes a arqueobacterias metanógenas, en tapetes microbianos hipersalinos, es un tema no esclarecido, pese a que actualmente se considera como sustrato no competitivo.

5.6 Incubaciones con BES

Durante el presente trabajo se probaron 5 diferentes sustratos para la estimulación de la metanogénesis y la sulfato reducción: hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina. Para descartar el uso de estos sustratos por arqueobacterias metanogénicas, se realizaron las mismas incubaciones incluyendo el inhibidor selectivo de la metanogénesis, ácido bromoetanosulfónico (BES) (Tabla 2). La adición de este compuesto mostró una eficiente inhibición sobre la metanogénesis, sin embargo, también inhibió la sulfato reducción en casi todos los experimentos con excepción del lactato. El único antecedente que en nuestro conocimiento presenta evidencias de una inhibición similar, fue realizado por Kjeldsen *et al.* (2007), quienes cuantificaron la producción H_2S en incubaciones de tapetes microbianos adicionados con distintos sustratos y encuentran diferencias entre los enriquecimientos de metanol y metanol+BES, reportando una producción de 1.1 y 0.3 mM de H_2S , respectivamente. Sin embargo, en su trabajo no discuten los mecanismos que podrían explicar estos resultados.

El BES es un inhibidor selectivo de la metanogénesis debido a que este compuesto es estructuralmente análogo a la Coenzima-M (2-mercapto-etano sulfonato), la cual en el paso final de la metanogénesis transfiere un grupo metil a la metil-coenzima M reductasa. La Coenzima-M es un compuesto abundante en las arqueobacterias metanogénicas, por lo que se cree que cuando existe la lisis celular de estos organismos, la Coenzima-M puede ser liberada en cantidades sustanciales en el ecosistema, representando un potencial sustrato para otros microorganismos. De esta forma, se ha encontrado el uso del BES (por ser

análogo de la Coenzima-M) como aceptor de electrones (Ettwig 2006). Los resultados muestran que aparentemente la adición de BES inhibió la actividad sulfato reductora o en su defecto, que la adición del BES promovió otros metabolismos dentro de los microcosmos. En la actualidad el uso de BES como sustrato es un tema poco estudiado y el conocimiento es exiguo al respecto. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los ambientes hipersalinos representan un excelente sitio de estudio para analizar el papel del BES durante la degradación de la materia orgánica en el ecosistema.

5.7 Comparación de procesos sulfato-reductores

La sulfato reducción es un proceso ecológico y biogeoquímico de importancia en ambientes hipersalinos. Las tasas sulfato reductoras más altas reportadas en la literatura han sido medidas en estos ecosistemas (Brandt *et al.* 2001). Se estima que este proceso puede ser responsable de ~80% de la oxidación de carbono en ambientes salinos (Baumgartner *et al.* 2006).

Todos los sustratos probados en el presente estudio, mostraron una producción de H₂S estadísticamente mayor que la del control sin sustrato (P<0.005) (Fig. 10, Tabla 3), sugiriendo que todos los sustratos probados potencialmente podrían haber sido utilizados por bacterias sulfato reductoras. Particularmente, el metanol y la trimetilamina, son sustratos que no habían sido reportados para sulfato reducción en ambientes hipersalinos, por lo que el presente estudio aporta nueva información a la discusión entre la competencia por los mismos sustratos entre arqueobacterias metanogénicas y bacterias sulfato reductoras, mostrando un potencial flujo de energía entre ambos grupos microbianos, no considerado previamente para el entendimiento de los ecosistemas hipersalinos.

Dado que los sustratos que más estimularon la sulfato reducción fueron el lactato y el acetato, esta evidencia sugiere que las comunidades sulfato reductoras naturales se encuentran limitadas en carbono (Brandt *et al.* 2001). Posteriormente,

el hidrógeno fue el sustrato que más estimuló la producción de sulfuro. En concordancia, se ha encontrado que las bacterias sulfato reductoras constituyen los principales grupos de hidrogenotróficos en estos ecosistemas (Burow *et al.* 2012 y Lee *et al.* 2014) Por último, los resultados indican que la trimetilamina y el metanol, pueden ser utilizados por bacterias sulfato reductoras, aunque en menor proporción comparado con los otros sustratos estudiados, probablemente, debido a que existen otros miembros de la comunidad que también están utilizando dichos sustratos. Nuestros resultados sugieren abrir de nuevo la discusión si realmente existen sustratos “no competitivos” en ambientes hipersalinos. Por ello, estudios más profundos son necesarios para elucidar el destino real de estos sustratos de relevancia dentro del ecosistema y conocer la diversidad microbiana asociada a su degradación.

5.8 Comparación de procesos metanogénicos

La metanogénesis en ambientes hipersalinos es un proceso bien documentado (McGenity 2010). En el presente trabajo, los sustratos que más estimularon la actividad metanogénica fueron la trimetilamina y el metanol. En concordancia, múltiples evidencias ha demostrado que la ruta metanogénica metilotrófica es predominante en estos ecosistemas, debido a la fuerte competencia por los sustratos hidrógeno y acetato con bacterias sulfato reductoras (King 1989, Oren 1990 y McGenity 2010). Kelley *et al.* (2015), a través de análisis isotópicos, determinaron que la trimetilamina y el metanol contribuyen entre 55-92% y 8-40%, respectivamente, del metano total generado en estos ecosistemas.

Inesperadamente, en los experimentos con lactato (el cual puede ser convertido a acetato por acetogénesis) y acetato, se observó producción de metano estadísticamente diferente al control sin sustrato ($P < 0.005$), sugiriendo una actividad metanogénica acetoclástica. El único antecedente que reporta una potencial actividad metanogénica acetoclástica en ambientes hipersalinos fue realizado por Potter *et al.* (2009); sin embargo, la identidad de los

microorganismos que lleva a cabo la metanogénesis, en función del sustrato utilizado, permanece incomprendida.

6 Conclusiones

Durante el presente trabajo se evaluó la competencia por diferentes sustratos entre la metanogénesis y la sulfato reducción en ambientes hipersalinos. Se probaron 5 diferentes sustratos de relevancia ecológica: hidrógeno, lactato, acetato, metanol y trimetilamina. Los resultados mostraron que los 5 sustratos probados potencialmente pueden ser utilizados para la sulfato reducción. Así, se evidenció una potencial competencia por los sustratos denominados no competitivos trimetilamina y metanol, por bacterias sulfato reductoras y arqueobacterias metanógenas. Dado que la trimetilamina no había sido reportada previamente como sustrato para bacterias sulfato reductoras en ambientes hipersalinos, se propone la ecuación estequiométrica como potencial mecanismo de reacción. No obstante, para corroborar estos resultados, es necesario profundizar con distintas aproximaciones isotópicas y moleculares que complementen esta información.

Por otro lado, se corroboró que la ruta metanogénica metilotrófica es predominante en estos ecosistemas, siendo la trimetilamina y el metanol los sustratos que más estimularon la producción de metano. Adicionalmente, se encontró una producción de metano en los experimentos de lactato y acetato sólo cuando el sulfato fue retirado del medio, siendo así el primer reporte de una potencial actividad metanogénica acetoclástica en ambientes hipersalinos.

Bibliografía

Abed R.M.M., De Beer D. y P. Stief. 2015. Functional-structural analysis of nitrogen-cycle bacteria in a hypersaline mat from Omani Desert. *Geomicrobiology Journal*. 32:119-129.

Aicher A. y T.J. Mincer. 2014. Volatile organic molecule production by cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton. Paper presented at the American Society of Microbiology meeting, Boston, 17–20.

Baumgartner L.K., Reid R.P., Dupraz C., Decho A.W., Buckley D.H., Spear J.R y P.T. Visscher. 2006. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*. 185(3):131-145.

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

Bodelier P. L.E. y Steenbergh A. K. 2012. Interactions between Methane and Nitrogen Cycling: Current Metagenomic Studies and Future Trends. En: *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Applications* Caister Academic Press. 33-63.

Borrel G, O'Toole P.W., Harris H.M., Peyret P., Bruguère J.F. y S. Gribaldo. 2013. Phylogenomic data support a seventh order of Methylophilic methanogens and provide insights into the evolution of Methanogenesis. *Genome Biol Evol*. 5(10):1769-1780.

Bothe H., Schmitz O., Yates M.G. y W.E. Newton. 2010. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*. 74(4):529-551.

Burow L.C., Woebken D., Bebout B.M., McMurdie P.J., Singer S.W., Pett-Ridge J., Prufert-Bebout L., Spormann A.M., Weber P.K. y T.M. Hoehler. 2012. Hydrogen production in photosynthetic microbial mats in the Elkhorn Slough estuary, Monterey Bay. *ISME Journal*. 6: 863–874.

Burow Lc., Woebken D., Marshall I.P.G., Singer S.W., Pett-Ridge J., Prufert-Bebout , Spormann A.M., Bebout B.M., Weber P.K. y T.M. Hoehler. 2014. Identification of Desulfobacterales as primary hydrogenotrophs in a complex microbial mat community. *Geobiology*. 12, 221-230.

Chacón E. 2010. Microbial Mats as a Source of Biosignatures. Pp. 149–181. En: Seckbach y Oren (eds.). *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*.

Springer Netherlands. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. 14:610.

Colby B.J. y L.Z. Zatman. 1973. Trimethylamine Metabolism in Obligate and Facultative Methylotrophs. *Biochem. J.* 132:101-112.

Des Marais D. 2003. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biol. Bull.* 204:160-167.

Des Marais. 2010. Marine Hypersaline Microcoleus-Dominated Cyanobacterial Mats in the Saltern at Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. Pp. 401–420. En: J. Seckbach y A. Oren (eds.), *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology.

Ettwig A. 2006. Degradation of 2-bromo-ethane sulfonate (BES) and 2-mercapto-ethane sulfonate (coenzyme M) by anaerobic enrichment cultures. Microbial Diversity Course, Woods Hole.

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

García-Maldonado J.Q., Bebout B.M., Everroad R.C. y A. López-Cortés. 2015. Evidence of novel phylogenetic lineages of methanogenic archaea from hypersaline microbial mats. *Microbial ecology*, 69(1):106-117.

Gerdes G. 2007. Structures left by modern microbial mats in their host sediments. Pp. 1–56. En: Schieber J., Bose P., Eriksson P., Banerjee S., Sarkar S., Wladyslaw A. y O. Catuneanu (eds.). *Atlas of Microbial Mat Features Preserved within the Siliciclastic Rock Record*. Elsevier. 324 p.

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

Hoffmann D., Maldonado J., Wojciechowski M.F y F. Garcia-Pichel. 2015. Hydrogen export from intertidal cyanobacterial mats: sources, fluxes, and the influence of community composition. *Environmental Microbiology*. 10:3738–3753

Javor B. 1989. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. Springer:Verlag. Series in contemporary bioscience. N. Y.

Kelley C.A., Prufert-Bebout L.E. y B.M. Bebout. 2006. Changes in carbon cycling ascertained by stable isotopic analyses in a hypersaline microbial mat. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*. 111 p.

Kelley C.A., Chanton J. P. y B.M. Bebout. 2015. Rates and pathways of methanogenesis in hypersaline environments as determined by ¹³C-labeling. *Biogeochemistry* 13 p.

King M.G. 1988. Methanogenesis from methylated amines in a hypersaline algal mat. *Applied and environmental microbiology*. 54:130-136.

King M.G., M.J. Klug y D.R. Lovley. 1984. Metabolism of acetate, methanol and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(6):1848-1853.

Kjeldsen K.U., Loy A., Jakobsen T.F., Thomsen T.R., Wagner M. y K. Ingvorsen. 2007. Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS microbiology ecology*. 60(2):287-298

Koschorreck M., Kunze T., Luther G., Bozau E. y K. Wendt-Potthoff. 2004. Accumulation and inhibitory effects of acetate in a sulphate reducing in situ reactor for the treatment of an acidic pit lake. *Mine Water*. 101-109.

Lee J.Z., Burow J.C., Woebken D., Everroad R.C., Kubo M.D., Spormann A.M., Weber P.K., Pett-Ridge J., Bebout B.M. y T.M. Hoehler. 2014. Fermentation couples *Chloroflexi* and sulfate-reducing bacteria to *Cyanobacteria* in hypersaline microbial mats. *Frontiers in Microbiology*. 6: 61p.

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

Liamleam W. y A.P. Annachhatre. 2007. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*. 25:452-463.

Litchfield C. 1998. Survival strategies for microorganism in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics and Planetary Science*. 33:813–819.

Liu Y. 2010. Taxonomy of methanogens. En: Timmis K.N. (eds.). Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. *Springer-Verlag Heidelberg*.

López-Cortés A. 1998. Ecología y biotecnología de las comunidades microbianas. *Ciencia y Desarrollo*. 134 (25):10-17.

Lovley D.R., Dwyer D.F. y M.J. Klug. 1982. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1373-1379.

Maillacheruvu K.Y., y G.F. Parkin. 1996. Kinetics of growth, substrate utilization and sulphide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers in anaerobic systems. *Water Environment Research* 68:1099-1106

Margesin R. y F. Schinner. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 2:73-83.

Meiber J.B.M. y W. Harder. 1978. Aerobic and anaerobic metabolism of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in *Hyphomicrobium* x. *Journal of General Microbiology*. 106:265-276

Muyzer G. y Stams A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 6, 441-454.

McGenity T.J. 2010. Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. En: Timmis K.N. (eds.) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 665-680 p.

Nanninga H.J. y J.C. Gottschal. 1986. Isolation of a sulfate-reducing bacterium growing with methanol. *FEMS Microbial Ecology*.

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

Oremland RS y G.M. King GM. 1989. Methanogenesis in hypersaline environments. En: Cohen Y y Rosenberg E (Eds.) Microbial Mats. Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities (pp 180-190). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Oremland R.S. y Polcin. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1270-1276.

Oren A. 1990. Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 58:291-298.

Oren, A. 1995. Uptake and turnover of acetate in hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18:75-84.

Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(2):334-348.

Oren A. (2006). The order halobacteriales. In *The prokaryotes* (pp. 113-164). Springer New York.

Oren A. 2011. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*. 13:1908-1923.

Oren A. 2015. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24(4):781-798.

Oren A. y P. Gurevich 1994. Production of D-lactate, acetate, and pyruvate from glycerol in communities of halophilic archaea in the Dead Sea and in saltern crystallizer ponds. *FEMS microbiology ecology*, 14(2):147-155.

Potter E.G, Bebout B.M y C.A Kelley. 2009. Isotopic composition of methane and inferred methanogenic substrates along a salinity gradient in a hypersaline microbial mat system. *Astrobiology*. 9:383-390.

Rothrock M.J. y F. García-Pichel. 2005. Microbial diversity of benthic mats along a tidal desiccation gradient. *Environmental Microbiology*. 7:593-601.

Schink B., y J. Zeikus. 1982. Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. *Journal of General Microbiology*. 128:393-404.

Schink B. y J. Zeikus. 1980. Microbial methanol formation: a major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology*. 4:387-389.

Schönheit P., Kristjansson K. y R.T. Thauer. 1982. Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Arch. Microbiol.* 132:285-288

Severin I. y Stal L.J. 2010. Diazotrophic microbial mats. Pp. 321–339. En: Seckbach J. y A. Oren (eds.). *Microbial Mats Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer Netherlands. *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. 14:610 p.

Skyring G.W. 1988. Acetate as the main energy substrate for the sulfate-reducing bacteria in Lake Eliza (South Australia) hypersaline sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 4(2):87-93.

Smith J.M., Green S.J., Kelley C.A., Prufert-Bebout L. y B.M. Bebout. 2008. Shifts in methanogen community structure and function associated with long-term manipulation of sulfate and salinity in a hypersaline microbial mat. *Environmental microbiology*, 10(2):386-394.

Sorokin D., Kublanov I., Gavrillov S., Rojo D., Roman P., Golyshin P., Slepak P., Smedile F., Ferrer M., Messina E., La Cono V. y M.M. Yakimov. 2016. Elemental sulfur and acetate can support life of a novel strictly anaerobic haloarchaeon. *The ISME Journal*, 10(1):240-252.

Sørensen J., Christensen D. y B.B. Jørgensen. 1981. Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(1):5-11.

Tambekar DH., Rajgire A.V. y A.P. Kudbe. Detoxification of methanol by methylotrophic bacteria isolated from hypersaline environment. *Indian Journal of Applied Research*. 8:319-321.

Teske A., Ramsing N.B., Habicht K., Fukui M., Küver J., B.B. Jørgensen y Y. Cohen. 1998. Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8):2943.

Welsh D.T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 263-290.

Zhilina T.N. y G. A. Zavarzin. 1990. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 7:315-321.