



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS DE COMUNIDADES DE BACTERIAS Y ARQUEAS EN  
TAPETES MICROBIANOS HIPERSALINOS, CON ÉNFASIS EN  
ARQUEAS METANÓGENAS METILOTRÓFICAS DEPENDIENTES  
DE HIDRÓGENO.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Patricia Jaqueline Ramírez Arenas**

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2021.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 27 del mes de septiembre de 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"ANÁLISIS DE COMUNIDADES DE BACTERIAS Y ARQUEAS EN TAPETES MICROBIANOS HIPERSALINOS, CON ÉNFASIS EN ARQUEAS METANÓGENAS METILOTRÓFICAS DEPENDIENTES DE HIDRÓGENO"**

Presentada por el alumno:

**Patricia Jaqueline Ramírez Arenas**

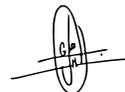
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

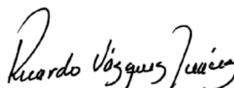
### LA COMISIÓN REVISORA



**Dr. Alejandro López Cortés**  
Co-Director de Tesis



**Dr. José Quinatzin García Maldonado**  
Co-Director



**Dr. Ricardo Vázquez Juárez**  
Tutor



**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro**  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a **28 de septiembre** de 2021.

Los miembros del comité de tesis la estudiante **Patricia Jaqueline Ramírez Arenas** del Programa de Maestría en en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

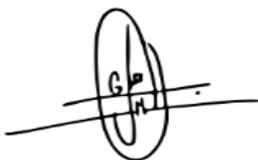
- Herramienta antiplagio:  
Ithenticate
- Filtros utilizados:  
Excluir citas  
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis Posgrado  
Se muestra captura de pantalla

APETES		Citas excluidas	12%
		Bibliografía excluida	SIMILAR
<b>Resumen de Coincidencias</b>			
1	Internet 309 palabras Copiado el 05-May-2021 <a href="http://repositorio.ipicyt.edu.mx">repositorio.ipicyt.edu.mx</a>		1%
2	Internet 237 palabras Copiado el 20-Jul-2016 <a href="http://docslide.us">docslide.us</a>		1%
3	Internet 211 palabras <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>		1%
4	Internet 169 palabras Copiado el 21-Jul-2020 <a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a>		1%
5	Internet 118 palabras Copiado el 15-Jul-2020 <a href="http://repository.javeriana.edu.co">repository.javeriana.edu.co</a>		<1%
6	Internet 110 palabras Copiado el 19-Ene-2020 <a href="http://www.scribd.com">www.scribd.com</a>		<1%

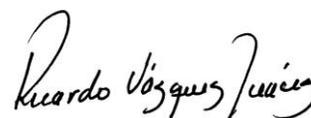
**Firmas del comité**



**Dr. Alejandro López Cortés**  
Co-Director



**Dr. José Quinatzin García Maldonado**  
Co-Director



**Dr. Ricardo Vázquez Juárez**  
Co-Tutor

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Alejandro López Cortés  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Director de Tesis

Dr. José Quinatzin García Maldonado  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Mérida  
Co-Director de Tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Alejandro López Cortés  
Dr. José Quinatzin García Maldonado  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

### **Jurado del Examen**

Dr. Alejandro López Cortés  
Dr. José Quinatzin García Maldonado  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

### **Suplente**

Dra. Regina Elizondo González

## Resumen

La comprensión de la diversidad filogenética de arqueas metanógenas se ha incrementado en los últimos años, gracias a la detección de nuevos linajes metilotróficos dependientes de hidrogeno, que carecen de la vía metabólica *Wood-Ljungdahl* para la generación de energía y fijación de dióxido de carbono. Estos microorganismos han sido detectados en una gran variedad de hábitats, sin embargo, la ocurrencia de este metabolismo en tapetes microbianos hipersalinos ha sido poco explorado. En el presente trabajo se analizó la composición y estructura de las comunidades de Bacteria y Arquea en tapetes microbianos de dos sitios con diferente salinidad, con especial énfasis en arqueas metanogénicas, a través de la secuenciación masiva del gen que codifica para la subunidad 16S ARNr, y su relación con las variables ambientales. El análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) evidenció que, de los parámetros estimados, la concentración de oxígeno, materia orgánica y salinidad fueron las principales variables ambientales que explicaron la varianza de la estructura de la comunidad microbiana. Además, los análisis bioinformáticos permitieron reconocer que, a pesar de la dominancia de microorganismos relacionados con el ciclo del carbono y el azufre, los tapetes microbianos de Guerrero Negro también albergan microorganismos del Orden *Methanofastidiosales* y miembros de los Phyla *Bathyarchaeota* y *Thermoplasmata*, que potencialmente están relacionados con la metanogénesis metilotrófica dependiente de hidrógeno. Los resultados de este trabajo contribuyen con el repertorio de la diversidad filogenética de arqueas metanógenas y serán de utilidad en futuros estudios para determinar la contribución de estos microorganismos en el funcionamiento del ecosistema hipersalino.

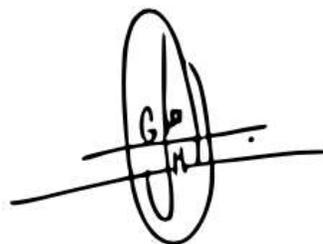
**Palabras clave:** *Guerrero Negro; metanógenas; tapetes microbianos hipersalinos; 16S ARNr.*

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5198-0390>



---

Vo. Bo. Dr. Alejandro López Cortes  
Co-Director de Tesis



---

Vo. Bo. Dr. José Quinatzin García Maldonado  
Co-Director de Tesis

## Summary

The understanding of the phylogenetic diversity of methanogenic archaea has been recently increased, through the detection of new hydrogen-dependent methylotrophic lineages which lack the *Wood-Ljungdahl* metabolic pathway for energy generation and carbon dioxide fixation. These microorganisms have been detected in several habitats, however, the occurrence of this metabolism in hypersaline microbial mats has been poorly explored. In this work, the composition and structure of the Bacteria and Archaea communities in microbial mats from two sites with different salinity were analyzed, with special emphasis on methanogenic archaea, through the massive sequencing of the gene that codes the 16S rRNA subunit, and its relationship with environmental variables. The permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) results showed that, of the estimates parameters, the oxygen concentration, organic matter and salinity, were the main environmental variables explaining the variance of the microbial community structure. In addition, bioinformatic analyzes allowed to recognize that, despite the dominance of carbon and sulfur cycle involved microorganisms, the microbial mats from Guerrero Negro also harbor microorganisms of the *Methanofastidiosales* Order and members of the *Bathyarchaeota* and *Thermoplasmata* Phyla, which are potentially related to hydrogen-dependent methylotrophic methanogenesis. The results of this work contribute to the repertoire of the phylogenetic diversity of methanogenic archaea and will be useful in future studies to determine the contribution of these microorganisms in the hypersaline ecosystem functioning.

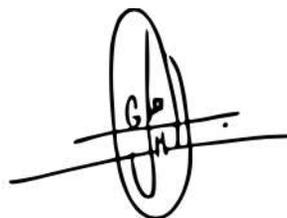
**Keywords:** Guerrero Negro; methanogen archaea, hypersaline microbial mat; 16S rRNA.

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5198-0390>



---

Vo. Bo. Dr. Alejandro López Cortes  
Co-Director de Tesis



---

Vo. Bo. Dr. José Quinatzin García Maldonado  
Co-Director de Tesis

**Dedicatoria**

*A mi amada familia, por ser el pilar más grande de mi vida.*

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue desarrollado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Beca de Manutención para nivel de maestría 744838; y con el Proyecto de la Convocatoria de Ciencia de Frontera 2019 (848287), *“Investigaciones modernas de la biosfera rara en ambientes hipersalinos: Desentrañando la diversidad y el metabolismo poco explorado de las arqueas metanogénicas”* asignado al Dr. Alejandro López Cortés, Dr. José Q. García Maldonado y la Dra. Maurilia Rojas Contreras. El trabajo de campo se desarrolló bajo el permiso de pesca de fomento a extranjeros No. PPF/DGOPA-008/19, expedido a favor de Dr. Brad Bebout, NASA-Ames, CA.

A la empresa salinera Exportadora de Sal S.A. Guerrero Negro, Baja California Sur, México por el acceso a sus instalaciones para colecta de muestras, expresando mi reconocimiento a su labor de preservar tan valiosos tapetes microbianos.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y en particular al Programa de Estudios de Posgrado por el apoyo proporcionado para mi formación académica.

Al Dr. Alejandro López Cortés por darme la oportunidad de seguir mis sueños y enseñarme a creer en mí. Por guiarme y apoyarme de manera extraordinaria en mi formación académica a pesar de las circunstancias, por sus consejos, enseñanzas, entusiasmo, paciencia y dedicación; por compartir conmigo su fascinación por el microcosmos e inspirarme a seguir aprendiendo.

Al Dr. José Quinatzin por su gran orientación y apoyo pese a la distancia geográfica; por estar al pendiente de mi formación y enriquecer mi conocimiento con su experiencia.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez por su empeño en mi formación académica y sus valiosas aportaciones y sugerencias a fin de mejorar mi trabajo.

Al Dr. Santiago Cadena Rodríguez por su valiosa orientación en los análisis bioinformáticos.

A mi querido círculo de amigos: Daniela, Miranda, Aldahir, Giovanni, David, Ayenia, Barbara y Carlos por las aventuras, los aprendizajes, las risas, los ánimos y su incondicional apoyo. Por estar presentes, aun en la distancia y llenar mis días de alegría con sus ocurrencias.

A mi familia, porque cada logro es también suyo. Por hacer de mí quién soy. Por animarme, motivarme e inspirarme a ir en busca de mis sueños. Por ser quienes requiero que sean cuando requiero que sean.

A él, que confía en mí y en todo lo que sueño; que me cuida, escucha y acompaña.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	ix
<b>Abreviaturas</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. Análisis de comunidades microbianas.....	3
2.1.1 Aproximaciones independientes de cultivo en el estudio de las comunidades microbianas.....	5
2.2. Arqueas metanógenas en tapetes microbianos hipersalinos.....	5
2.3. Arqueas metanógenas y su repertorio metabólico.....	8
2.3.1. Metanogénesis hidrogenotrófica.....	10
2.3.2. Metanogénesis acetoclástica.....	13
2.3.3. Metanogénesis metilotrófica.....	15
2.3.4. Metanogénesis metilotrófica dependiente de hidrogeno.....	15
2.4. Diversidad y distribución de arqueas metanógenas.....	17
2.5 Linajes metanógenos metilotróficos dependientes de hidrógeno.....	19
2.5.1. Methanomassiliicoccales.....	20
2.5.2. Methanofastidiosales.....	22
2.5.3. Bathyarchaeota.....	23
2.5.4. Verstraetearchaeota.....	25
<b>3. JUSTIFICACION</b> .....	27
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos particulares.....	31
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32
6.1. Descripción del sitio.....	32
6.2. Muestreo de tapetes microbianos.....	33
6.3. Extracción de ácidos nucleicos y secuenciación de amplicones del gen que codifica para 16S ARNr.....	34
6.4. Análisis Bioinformático.....	34
6.4.1. Métricas de diversidad.....	35
6.4.2. Análisis de abundancia diferencial.....	35
6.4.3. Distribución y análisis filogenético de grupos metanogénicos.....	36
<b>7. RESULTADOS</b> .....	37
7.1. Determinación de las variables fisicoquímicas en muestras de salmuera y tapetes microbianos.....	37

7.2 Métricas de Secuenciación .....	38
7.3. Índices de diversidad microbiana en los sitios de muestreo .....	39
7.4. Análisis de la estructura de la comunidad de bacterias y arqueas en los sitios de muestreo .....	39
7.5. Relación de los parámetros ambientales sobre la estructura de las comunidades microbianas.....	41
7.6. Composición de las Comunidades de Bacteria y Arquea .....	42
7.7. Análisis de abundancia diferencial de las comunidades microbianas.....	47
7.8 Detección de arqueas metanógenas ajenas al Orden de los <i>Methanosarcinales</i> .....	48
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
8.1. Diversidad Microbiana .....	52
8.2 Estructura y Composición de las Comunidades Microbianas.....	54
8.3 Correlación entre los análisis fisicoquímicos y las diferencias encontradas en el análisis de comunidades microbianas .....	60
8.4 Reconstrucción de los procesos sintróficos del tapete microbiano a partir de los grupos detectados .....	62
8.5 Análisis filogenético de arqueas metanógenas fuera del Orden <i>Methanosarcinales</i> en los tapetes microbianos de Guerrero Negro.....	65
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>10. LITERTATURA CITADA</b> .....	<b>70</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>90</b>

## Lista de figuras

- Figura 1.** Reacciones de la vía reductora del acetyl-CoA o *Wood-Ljungdahl*. El monóxido de carbono (CO) está unido a un átomo de Fe en la CO-deshidrogenasa y el grupo metilo (CH<sub>3</sub>) a un átomo de níquel en un compuesto de níquel orgánico de la CO-deshidrogenasa. Obsérvese cómo la formación del acetyl-CoA se acopla a la generación de una fuerza Na<sup>+</sup> motriz que impulsa la síntesis de ATP, y que el ATP también se sintetiza en la conversión del acetyl-CoA a acetato. THF: tetrahidrofolato; B<sub>12</sub>: vitamina B12 en un intermediario unido a la enzima (Modificado de Brock, 2015). .....11
- Figura 2.** Posible evolución de la metanogénesis en Arquea. (A) La metanogénesis hidrogenotrófica (o reductora de dióxido de carbono) (azul) se observó previamente exclusivamente en el superphylum Euryarchaeota, mientras que la metanogénesis metilotrófica (púrpura) se encontró también en el superphylum TACK. (B) El descubrimiento de la vía hidrogenotrófica completa en *Verstraetearchaeota*, un miembro del superphylum TACK, sugiere que esta vía estaba presente en el último ancestro común de *Verstraetearchaeota* y *Euryarchaeota*. (C) Esta propuesta apoya también la hipótesis de que la metanogénesis metilotrófica es una adaptación posterior [incluida la posible transferencia horizontal de metiltransferasas (línea discontinua verde)] de la forma reductora de CO<sub>2</sub> más primitiva, y refuerza aún más la noción de que LUCA era un metanógeno reductor de dióxido de carbono (Modificado de Berghuis et al. 2019). .....13
- Figura 3.** Descripción general de las vías de metanogénesis encontradas en Arquea: hidrogenotrófica, acetoclástica, metilotrófica y la recién descrita: metilotrófica dependiente de hidrógeno. La evidencia fisiológica, bioquímica o genómica de enzimas específicas se indica con círculos de colores. El código de color resalta partes seleccionadas de rutas específicas de metanogénesis, así como la presencia de enzimas dentro de linajes de arquea seleccionados. Tomado de Söllinger y Urich, (2019). .....14
- Figura 4.** Reacciones de metanogénesis a través de la vía metilotrófica dependiente de hidrógeno en miembros del orden *Methanomassiliicoccales* (reproducido de Lang et al., 2015). Designaciones y abreviaturas: \*, enzimas asociadas a la membrana; \*\*, metiltransferasas específicas de sustrato que dependen del sustrato de crecimiento, por ejemplo: metanol-CoM-metiltransferasa (Mta); monometilamina metiltransferasa (Mtm); dimetilamina metiltransferasa (Mtb); trimetilamina metiltransferasa (Mtt); metilcobamida-CoM-metiltransferasa (MtbA); F<sub>red</sub>, ferredoxina reducida; F<sub>ox</sub>, ferredoxina oxidada; F<sub>po</sub>, F<sub>420H2</sub>: complejo de tipo fenazina oxidorreductasa; H<sub>dr</sub>, heterodisulfuro reductasa; M<sub>cr</sub>, metil-coenzima M reductasa; M<sub>vh</sub>, hidrogenasa no reductora de F<sub>420</sub>. .....21
- Figura 5.** Diferentes configuraciones para el funcionamiento asociado o independiente de la ruta Wood-Ljungdahl (WLP) de Arquea y la metanogénesis. Los complejos o vías enzimáticas faltantes están sombreados en gris. Se muestran los siguientes: metanogénesis reductora de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) presente en los *Metanohydrogenales*, así como metanógenos de clase I y clase II sin citocromos (izquierda); metanogénesis por reducción de compuestos metilados empleando hidrógeno, como se infiere en *Bathyarchaeota* y un enlace potencial con WLP en ausencia de MTR (centro); y metanogénesis por reducción de compuestos metilados usando hidrógeno como donador de electrones, como se propone en *Methanomassiliicoccales* (derecha) (Modificado de Berghuis et al., 2019). .....24
- Figura 6.** Mapa de sitio de estudio. Se muestran los estanques concentradores de la empresa Exportadora de Sal, S.A., en Guerrero Negro, Baja California Sur, México. Las estrellas negras

representan la ubicación del sitio ESSAA4N1 (estrella izquierda) y ESSAA5N4 (estrella derecha). Las flechas rojas indican la dirección del flujo del agua de mar en evaporación. Cada estanque es identificado mediante un número y las etiquetas azules corresponden al porcentaje de salinidad promedio (Modificado de Lee, 2016).....	32
<b>Figura 7.</b> Tapetes microbianos de A) ESSAA4N1 y B) ESSAA5N4, Guerrero Negro, Baja California Sur.....	38
<b>Figura 8.</b> Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) basado en la métrica de similitud de Bray-Curtis utilizando secuencias del gen que codifica para la subunidad 16S ARNr obtenidos de los sitios ESSAA4N1 (color rojo) y ESSAA5N4 (color azul) por triplicado. Una mayor distancia entre puntos indica que su diversidad de filotipos es más diferente o menos similar. Los valores de estrés <0,2 significan una representación confiable de los datos en una gráfica de dos dimensiones. ....	40
<b>Figura 9.</b> Abundancia relativa a nivel de Phylum de Bacteria y Arquea de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Exportadora de Sal S.A. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada Phylum. Los ASVs cuya abundancia relativa fue <1% se representan en color azul en la parte superior de las barras. ....	43
<b>Figura 10.</b> Abundancia relativa a nivel de Orden de Bacteria y Arquea de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Exportadora de Sal S.A. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada Orden. Los ASVs cuya abundancia relativa fue <1% se representan en color violeta bajo la leyenda de "Others". ....	44
<b>Figura 11.</b> Abundancia relativa a nivel de Género de Bacteria y Arquea de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Exportadora de Sal S.A. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada género. Los ASVs cuya abundancia relativa fue <1% se representan en color azul marino bajo la leyenda de "Others". ....	45
<b>Figura 12.</b> Composición de la comunidad del dominio Arquea correspondientes a las muestras de ESSAA4N1 y ESSAA5N4 de Exportadora de Sal S.A de C.V a nivel de <i>Orden</i> . Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada <i>Orden</i> . Las suscritas como " <i>Termoplasmatota_uncultured</i> " y " <i>Euryarchaeota_uncultured</i> " no alcanzaron una asignación taxonómica a nivel de orden, por lo que se especifica su Phylum. ....	46
<b>Figura 13.</b> Análisis discriminante lineal (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel de Phylum que resultaron diferencialmente abundantes entre las muestras de tapete microbiano de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 de la empresa Exportadora de Sal S.A, en Guerrero Negro B.C.S.....	48
<b>Figura 14.</b> Abundancia de los grupos de arqueas a nivel de Orden detectados en las muestras de tapetes microbianos de ESSAA4N1 y ESSAA5N4, la mayoría de ellas con valores <0,1% de la comunidad total. En el eje superior de la X se indican las muestras ordenadas jerárquicamente por área, el Orden se representa en el eje Y y su correspondiente abundancia se indica en la cuadrícula del mapa de calor. ....	50
<b>Figura 15.</b> Árbol filogenético de máxima verosimilitud, basado en la comparación de grupos metanogénicos potenciales detectados en tapetes microbianos hipersalinos de ESSA. (círculos rojos rellenos) con secuencias del gen de la subunidad 16S rRNA de arqueas metanogénicas. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei.....	51

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Límites superiores de tolerancia a la salinidad que han sido publicados a partir de experimentos de cultivos para valorar la metanogénesis con sustratos específicos (Oren, 2011).	8
<b>Tabla 2.</b> Principales reacciones para la metanogénesis (Lang et al., 2015; Thauer, 1998).	9
<b>Tabla 3.</b> Determinaciones fisicoquímicas en salmuera y tapetes microbianos en los sitios de muestreo.	37
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento de secuenciación del gen del 16S de ARNr luego del multiplexado, <i>denoising</i> y control de calidad de amplicones.	38
<b>Tabla 5.</b> Descriptores de alfa diversidad. Secuencias, ASVs observados, estimador de Chao e índices de Shannon-Wiener y Simpson obtenidos a partir de la caracterización de la comunidad microbiana de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4.	39
<b>Tabla 6.</b> Prueba PERMANOVA realizada en la matriz de distancia UniFrac, basada en datos de secuenciación masiva del gen 16S ARNr y su relación con las variables ambientales medidas en este estudio.	41

## Abreviaturas

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>A4N1</b>	Área 4 cerca de área 1
<b>A5N4</b>	Área 5 cerca de área 4
<b>Acs</b>	Acetil-Coenzima A sintasa
<b>AGVs</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>ASVs</b>	Variantes de secuencia de amplicones (Amplicon Sequence Variants)
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BSR</b>	Bacterias sulfato reductoras
<b>Cdh</b>	Monóxido de carbono deshidrogenasa
<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CoM-HS</b>	Ácido 2-mercaptoetanosulfónico
<b>ESSA</b>	Empresa salinera Exportadora de Sal S.A.
<b>Fd</b>	Ferredoxina
<b>Fd<sub>red</sub></b>	Ferredoxina reducida
<b>Ftr</b>	Formilmetanofurano-tetrahidrometanopterina N-formiltransferasa
<b>Fwd</b>	Formilmetanofurano deshidrogenasa
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrogeno molecular
<b>hdr</b>	Complejo heterodisulfuro reductasa
<b>LefSe</b>	Análisis discriminante lineal por efecto de tamaño
<b>LUCA</b>	Ultimo ancestro común universal
<b>MAGs</b>	Genomas Ensamblados <i>a partir de</i> Metagenomas (Metagenome Assembly Genomes)
<b>Mch</b>	Metenil-H <sub>4</sub> MPT ciclohidrolasa
<b>MCG</b>	Grupo Misceláneo Crenarchaeota (Miscellaneous Crenarchaeotal Group)
<b>MCR</b>	Complejo metil-coenzima M reductasa
<b>Mcr</b>	Metil-coenzima M reductasa
<b>mcrA</b>	Gen codificante para la metil-coenzima M reductasa
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Mer</b>	Metilen-H <sub>4</sub> MPT reductasa
<b>Mta</b>	Metanol-CoenzimaM-metiltransferasa
<b>Mtb</b>	Dimetilamina metiltransferasa
<b>Mtd</b>	Metilentetrahidrometanopterina deshidrogenasa
<b>Mtm</b>	Monometilamina metiltransferasa
<b>Mtr</b>	N5-metil-tetrahidrometanopterina:coenzima M metiltransferasa
<b>mrtA</b>	Gen codificante para la coenzima M metiltransferasa
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular
<b>PCoA</b>	Análisis de coordenadas principales
<b>PET</b>	Partículas exopoliméricas transparentes
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>PERMANOVA</b>	Análisis de varianza multivariante permutacional
<b>SPE</b>	Substancias poliméricas extracelulares

<b>TMA</b>	Trimetilamina
<b>TMCG</b>	Grupo Terrestre Diverso Crenarchaeota (Terrestrial Miscellaneous Crenarchaeotal Group)
<b>WLP</b>	Ruta metabólica Wood-Ljungdahl (Wood-Ljungdahl Pathway)

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha profundizado en la comprensión respecto a la diversidad de microorganismos pertenecientes al dominio Arquea debido a la descripción de una gran cantidad de linajes novedosos mismos que condujeron a la modificación del árbol filogenético de la vida como se conocía. Dentro de dicho dominio, *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota* habían sido reconocidos como los únicos dos *Phyla*, hasta hace aproximadamente dos décadas. El primero incluía principalmente microorganismos metanógenos y halófilos, en tanto el segundo se componía en su mayoría por termófilos extremos. Sin embargo, con el avance en las tecnologías de secuenciación, la metagenómica, enriquecimiento de bases de datos y el mejoramiento en los algoritmos de asignación taxonómica y ensamblaje, se ha revelado una gran cantidad de nuevos linajes, lo que condujo al reconocimiento de cuatro *Superphyla* filogenéticamente bien definidos: Euryarchaeota, TACK, DPANN y Asgard los cuales comprenden varios clados diferentes, potencialmente de rango *Phylum* (Adam et al., 2017; Barns et al., 1996; Zhang et al., 2020).

Los linajes de estos grupos no se limitan a hábitats extremos, como una vez se pensó que era común para las especies de arqueas; por el contrario, los descubrimientos más recientes destacan la amplia diversidad y ocurrencia de las arqueas en todos los entornos imaginables de la Tierra, donde llegan a constituir fracciones importantes de la biomasa microbiana (Spang et al., 2017).

Aunque es poco lo que se conoce sobre su fisiología dentro de su nicho ambiental o sus posibles relaciones sintróficas con otros organismos, hoy en día se dispone de información valiosa sobre la genómica, la proteómica y la fisiología de estos microorganismos que nos podría ayudar a comprender aspectos de su versatilidad metabólica, diversidad y distribución en diferentes entornos (Zou et al., 2020) y a reconocer las funciones ecológicas de las arqueas en los ciclos biogeoquímicos globales, cuya caracterización está siendo apoyada por estudios de cultivo y mediciones ambientales.

En ese contexto, la metanogénesis, como fase terminal de la biodegradación de la materia orgánica en muchos hábitats anóxicos, es un proceso ecológicamente importante a escala global que se lleva a cabo casi exclusivamente por microorganismos del Dominio Arquea (Liu y

Whitman, 2008a; Lyu y Lu, 2018; Thauer et al., 2008a) aunque esta aseveración se encuentra actualmente desafiada por el reciente descubrimiento de producción de metano por cianobacterias (Bižić-Ionescu et al., 2019) y producción aeróbica de metano en eucariotas (Lenhart et al., 2012a; Liu et al., 2015a).

Las arqueas metanógenas son un grupo de microorganismos que se encuentran en una gran variedad de ambientes anóxicos ya sea terrestres y acuáticos, naturales o antropogénicos, incluidos humedales, sedimentos de agua marina y dulce, tractos gastrointestinales de animales y plantas de tratamiento de aguas residuales, en los que los aceptores terminales de electrones, como oxígeno, nitrato, hierro (III) y sulfato se encuentran escasos o se agotan rápidamente (Söllinger y Urich, 2019). Estos microorganismos obtienen la energía para su crecimiento de la oxidación de un número limitado de sustratos, entre los que destaca el hidrógeno, el acetato y los compuestos metilados. A partir de ellos se establecen cuatro rutas metabólicas principales: hidrogenotrófica (mediante el uso de  $H_2/CO_2$ , formiato y CO como sustratos), acetoclástica (acetato), metilotrófica (compuestos metilados en  $C_1$ ) y metil-reductora (compuestos metilados en  $C_1$  como aceptores e  $H_2$  o formiato como donadores de electrones).

Ahora se sabe que la estructura y composición de la comunidad microbiana metanógena y las vías metabólicas que la acompañan depende en gran medida del entorno ecológico en el que se encuentra (Zhang et al., 2020). Sin embargo, pese a que la metanogénesis en ambientes hipersalinos está bien documentada (García-Maldonado et al., 2012, 2014, 2018; Robertson et al., 2009), poco es lo que se sabe sobre la diversidad filogenética, las rutas metabólicas y las funciones ecológicas de grupos metanógenos metilotróficos dependientes de hidrógeno en este tipo de entornos.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Análisis de comunidades microbianas**

En ecología, una comunidad se define como el conjunto de múltiples especies que viven e interactúan entre sí en un entorno contiguo dando lugar a propiedades emergentes (Clements, 1916). Sin embargo, cuando se trata de definir o delimitar una comunidad microbiana, la creación de gradientes químicos (Young et al., 2008), la fuerza de la interacción metabólica entre organismos y la definición rigurosa de una escala espacial (Konopka, 2009) hacen de ésta una tarea complicada.

Es innegable que el desarrollo de métodos de secuenciación independiente de cultivo en conjunto con la bioinformática, permitieron acceder a datos genómicos de un gran número de linajes, revolucionando el conocimiento de la diversidad y el potencial metabólico de los microorganismos en una amplia variedad de entornos. Particularmente, los métodos basados en la secuenciación del gen ribosomal 16S permitieron detectar y cuantificar los filotipos que son difíciles de cultivar y, por tanto, obtener una evaluación de la diversidad más completa de lo que era posible anteriormente (Bent y Forney, 2008).

Sin embargo, uno de los principales obstáculos para catalogar la diversidad microbiana y comprender el funcionamiento de las comunidades a esta escala radica en los patrones de distribución y de abundancia de las especies o filotipos que las componen (Curtis y Sloan, 2004). En otras palabras, la mayoría de las comunidades microbianas son caracterizadas en base a unos pocos taxones dominantes cuya abundancia enmascara la detección de una enorme cantidad de filotipos poco comunes, su abrumadora diversidad genética y los patrones de distribución individual (Sogin et al., 2006).

Esta característica de las comunidades microbianas expuso las limitaciones de los métodos actuales para detectar a los muchos miembros poco comunes que constituyen estas comunidades (Bent y Forney, 2008), los cuales, pese a no ser responsables de la mayor parte de actividad metabólica y flujo de energía en el sistema, sirven como reservorio de diversidad genética y funcional (Nandi et al., 2004; Yachi y Loreau, 1999), pudiendo volverse numéricamente importantes si cambian las condiciones ambientales. Idealmente, la presencia y abundancia de organismos poco comunes pero importantes se reflejaría en los valores de los

índices de diversidad (Bent y Forney, 2008). Pero eso no ocurre debido a las limitaciones inherentes impuestas por los métodos utilizados para caracterizar la comunidad (Dahllöf, 2002), de modo que la terminología, las métricas y los índices de diversidad deben aplicarse con cautela en los estudios sobre la ecología y biodiversidad de las comunidades microbianas (Bent y Forney, 2008).

A sabiendas de que no existe un valor absoluto y universalmente aceptado de la diversidad para definir una comunidad determinada (Ricotta, 2005), cada estimador de diversidad tiene sus propios sesgos y ventajas además de estar limitado por el método de medición (Hill et al., 2003). Cada método es una reducción ligeramente diferente de la información multivariada sobre una comunidad, de modo que su uso debe considerarse cuidadosamente y justificarse ecológica o biológicamente de acuerdo con la pregunta científica, para luego interpretarse considerando las fortalezas y limitaciones de la métrica de diversidad elegida (Shade, 2017).

Además de estos, también existen sesgos inherentes en los índices de diversidad que resultan de los métodos de secuenciación. Por ejemplo, las métricas pueden estar infladas por el ADN de organismos inactivos o dormantes (Jones y Lennon, 2010), los protocolos de extracción de ácidos nucleicos pueden sesgar la representación de ciertos grupos en la comunidad debido a una lisis celular oblicua (Shade, 2017), el uso de ciertos cebadores en la secuenciación de amplicones pudiera subestimar la diversidad al omitir o subrepresentar ciertos linajes microbianos (Klindworth et al., 2013) así como las múltiples copias de genes marcadores, como es el caso del gen de ARN ribosómico 16S (Stoddard et al., 2015) en los taxones que complican la percepción de su contribución relativa a la comunidad.

El cálculo de la diversidad para las comunidades microbianas y el análisis de sus patrones generales utilizando métodos directamente comparables a los estudios en ecología tradicional, requiere entonces de hacer un esfuerzo para estandarizar los sesgos entre las muestras antes de realizar comparaciones de diversidad e, incluso entonces, para interpretar los resultados (Shade, 2017), haciendo uso de datos contextuales y un número suficiente de observaciones.

### **2.1.1 Aproximaciones independientes de cultivo en el estudio de las comunidades microbianas**

Los primeros enfoques para describir la riqueza y composición de las comunidades microbianas distinguían a los organismos en función de sus características físicas y metabólicas. Sin embargo, la frecuente discrepancia entre los recuentos microscópicos directos y la cantidad de bacterias cultivables de muestras ambientales era uno de los tantos indicios de que nuestra visión de la diversidad microbiana era limitada (Amann et al., 1995). Por ejemplo, para hábitats acuáticos oligotróficos a mesotróficos, con frecuencia se informó que los recuentos microscópicos directos superaban los recuentos de células viables en varios órdenes de magnitud (Kogure et al., 1979).

Con la llegada de métodos moleculares basados en ácidos nucleicos, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el desarrollo de técnicas de secuenciación independientes de cultivo, se revolucionó el estudio de la ecología microbiana (Hirsch et al., 2010) y tuvo lugar el descubrimiento de amplia gama de nuevos grupos microbianos. Para detectarlos y poderlos identificar, los métodos filogenéticos moleculares basados en ácido ribonucleico (ARN) resultan de gran utilidad (Hirsch et al., 2010). Aunque se puede obtener información más precisa sobre qué genes funcionales están activos a partir de ARN mensajero (ARNm), el ARN ribosómico (ARNr) es más estable al poseer una estructura secundaria y estar asociado con proteínas ribosómicas, pudiendo sobrevivir durante meses en células moribundas o muertas en el suelo. Por esta razón, los análisis de abundancia y diversidad de ARNr se han utilizado para señalar la población activa dominante en comunidades microbianas, a pesar de que hoy se sabe, el número de ribosomas varía entre grupos (Janssen, 2006).

### **2.2. Arqueas metanógenas en tapetes microbianos hipersalinos**

Las comunidades microbianas con frecuencia se organizan como agregados o capas laminadas, incluyendo biopelículas y los tapetes (Paerl y Kuparinen, 2003; Stal y Caumette, 1994; Stal, 2012). Su estructura, proporciona un hábitat tridimensional en el que coexisten e interactúan poblaciones bacterias y arqueas metabólicamente diversas y algunas eucariotas. Estas interacciones conducen a la formación de gradientes biogeoquímicos pronunciados ( $O_2$ , pH, potencial redox) y propicia un conjunto de microambientes en los que las poblaciones

individuales pueden prosperar (Des Marais, 2003; Jørgensen et al., 1987; Paerl y Yannarell, 2010).

El intercambio de metabolitos y nutrientes entre poblaciones cuya tolerancia o requerimientos de crecimiento son distintos, permite su coexistencia como consorcios mutuamente beneficiosos en los que "*el desecho de un organismo es el tesoro de otro*" y asegura la supervivencia y el éxito reproductivo, incluso cuando se enfrentan a condiciones adversas como la privación de nutrientes, altas temperaturas, irradiación solar extrema y/o desecación periódica (Paerl et al., 2000). Si la última condición persiste, el ambiente puede resultar en un estado de hipersalinidad, donde las proporciones relativas de los distintos iones (como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ) son las mismas que en el agua de mar, pero la concentración total absoluta de los mismos es varias veces más alta (Brock, 2015).

En condiciones de hipersalinidad, las actividades metabólicas microbianas, incluidas aquellas que generan energía: fototrofia, litotrofia, heterotrofia así como aquellas involucradas en el crecimiento celular, se ven afectadas y con mayor frecuencia reducidas, en relación con las condiciones de menor salinidad (Javor, 1989; Paerl y Yannarell, 2010; Pinckney et al., 1995). En respuesta a dicho estrés, a menudo se forman biopelículas o tapetes unificados por un material mucoide, compuesto de sustancias poliméricas extracelulares [SPE] y partículas exopoliméricas transparentes [PET] que son excretadas por las poblaciones microbianas participantes (Decho et al., 2005; Paerl y Kuparinen, 2003).

Una característica común de los sistemas hipersalinos, como lagunas, lagos evaporíticos y salineras, es la presencia y persistencia de tapetes microbianos bentónicos (Paerl y Yannarell, 2010). Estos, se caracterizan por presentar patrones de laminación colorida, donde cada pigmentación corresponde a diferentes grupos con distintas funciones ecológicas. La parte activa de estos tapetes se localiza en los primeros 5 mm de la superficie y muestra coloraciones verdes, naranjas, rojas y negras, mientras que la laminación inferior corresponde a crecimientos anteriores en proceso de degradación. Los constituyen cientos de especies de microorganismos pertenecientes a más de 30 *Phyla* (categoría taxonómica superior) de Bacteria, representados por una gran variedad de capacidades para la obtención de energía y cuya actividad está gobernada por la disponibilidad de luz, oxígeno, condiciones de temperatura, condiciones

osmóticas, de pH, disponibilidad de bioelementos, macro y micronutrientes, entre otros (Brock, 2015).

Pese a las condiciones adversas bajo las cuales se desarrollan, más allá de exhibir una notable diversidad microbiana, funcionan como microecosistemas autosostenibles, en los que el carbono, el nitrógeno, el fósforo, el azufre y los metales pueden ciclar completamente entre formas oxidadas y reducidas (Paerl et al., 2000; Stal, 2000). Esto, además de garantizar la disponibilidad biológica de dichos elementos, también proporciona un acervo de agentes reductores y oxidantes, de modo que respalda las necesidades energéticas de una amplia variedad de microorganismos (Paerl y Yannarell, 2010) que incluye aquellos involucrados en la metanogénesis como fase final en la degradación de la materia orgánica.

A la fecha, se ha recopilado una extensa literatura empírica y teórica sobre el proceso de metanogénesis en ecosistemas salinos (desde ligeros a extremadamente salinos). De estos datos, se deduce que las relaciones competitivas entre los microorganismos metanógenos y las bacterias sulfato reductoras así como los mecanismos de osmoadaptación se encuentran entre los factores más importantes que afectan la metanogénesis hidrogenotrófica y acetoclástica en este tipo de entornos y que las tasas de producción de este gas se deben a la separación espacial de la metanogénesis y la reducción de sulfato (en sedimentos, la zona de metanogénesis a menudo se encuentra por debajo de una zona de reducción de sulfato) o al uso de sustratos no competitivos por organismos metanógenos (p. ej. metanol (MeOH), aminas metiladas, sulfuro de dimetilo).

Aunado a esto, datos experimentales confirman que son precisamente los metanógenos metilotróficos los más halotolerantes (Oren, 1999) y, por ende, los protagonistas en condiciones de hipersalinidad. La ocurrencia de la metanogénesis metilotrófica se puede dilucidar analizando los límites de salinidad, en el que es favorecido el crecimiento metanogénico con un determinado sustrato. Este límite va del 3% (García-Maldonado et al., 2014) hasta aproximadamente el 25% de salinidad total para la metanogénesis metilotrófica; el límite superior en el caso de la vía hidrogenotrófica es de aproximadamente la mitad (~12%), mientras que la metanogénesis acetoclástica es particularmente vulnerable al alto contenido de sal y no ocurre por encima del 6% (40 g/L NaCl) (Andrei et al., 2012; Kallistova et al., 2020; Oren, 1999).

Los límites de salinidad para las diferentes rutas metanogénicas utilizando sustratos específicos se muestran en la Tabla 1. Estos valores no deben considerarse el límite superior de actividad, sin embargo, muestran la importancia relativa de cada sustrato a diferentes niveles de salinidad.

**Tabla 1.** Límites superiores de tolerancia a la salinidad que han sido publicados a partir de experimentos de cultivos para valorar la metanogénesis con sustratos específicos (Oren, 2011).

Sustrato metanogénico		Límite superior de salinidad (ppm)
$C_2H_3O_2^-$	Acetato	60
$CO_2/H_2$	Dióxido de Carbono/Hidrógeno	120
	Compuestos metilados	250

Los factores limitantes de la metanogénesis en ambientes hipersalinos han sido elucidados a partir de estudios de incubación de sedimentos en condiciones anaerobias en los cuales la salinidad, la concentración de sulfatos, disponibilidad de sustratos, la competencia con bacterias sulfato reductoras por sustratos así como el tamaño relativo de la comunidad metanogénica son determinantes (García-Maldonado et al., 2014; King, 1988a; Oremland et al., 1982; Orphan et al., 2008).

### 2.3. Arqueas metanógenas y su repertorio metabólico

En 1933, Stephenson y Stickland, lograron el aislamiento del primer organismo metanogénico capaz de crecer en un medio inorgánico con formiato como única fuente de carbono y demostraron que la formación de metano a partir del formiato ocurre de manera escalonada, mediante la descomposición preliminar del ácido fórmico en dióxido de carbono e hidrógeno, seguida de una reducción del  $CO_2$  por el hidrógeno. Así mismo, evidenciaron cómo dicha reacción era protagonizada por una enzima capaz de activar el hidrógeno molecular, negando la participación del formiato como intermedio en la reducción de dióxido de carbono al metano. Este artículo marcó el comienzo de la era moderna para el estudio de la metanogénesis, al ser el primer estudio en lograr el aislamiento en cultivo puro de un metanógeno y documentar por primera vez las reacciones implicadas en la metanogénesis (Thauer, 1998).

Antes del descubrimiento de la metanogénesis aeróbica, se suponía que el metano era producido exclusivamente por arqueas metanogénicas, como fase terminal en la descomposición de compuestos orgánicos en condiciones anóxicas. Actualmente, se ha

demostrado que el metano puede ser producido bajo condiciones aeróbicas por bacterias heterótrofas marinas (Kamat et al., 2013; Repeta et al., 2016); cianobacterias (Bižić et al., 2019) y algunas células eucariotas (Lenhart et al., 2012b; Liu et al., 2015b).

La metanogénesis anaeróbica requiere de una serie de complejos enzimáticos únicos y coenzimas inusuales (Hedderich y Whitman, 2006), interrelacionadas y genéticamente muy similares. A pesar de su estrecha especialización metabólica, las arqueas metanogénicas poseen una distribución cosmopolita y son filogenéticamente diversas. Entre ellas, existen especies psicrófilas, mesófilas, termófilas, halófilas y haloalcalifílicas que emplean diferentes vías bioquímicas en su catabolismo (Kallistova et al., 2017).

La bioquímica y fisiología que involucra la producción de metano por Arquea ha sido ampliamente estudiada a partir de cultivos puros, sedimentos incubados (microcosmos) e *in situ* (Hedderich y Whitman, 2006).

**Tabla 2.** Principales reacciones para la metanogénesis (Lang et al., 2015; Thauer, 1998).

Reacción de la formación de metano (metanogénesis)	$\Delta G^{0'}$ , kJ/mol CH <sub>4</sub>
Metanogénesis dependiente de hidrógeno y formiato	
$4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135
$4\text{HCOO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 4\text{CO}_2$	-145
Metanogénesis acetoclástica	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-31
Metanogénesis metilotrófica y reductora de metilo	
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-104
$4(\text{CH}_3)_3\text{-NH}^+ + 9\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^- + 4\text{NH}_4^+ + 3\text{H}^+$	-76
$2(\text{CH}_3)_2\text{-S} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}_2\text{S} + \text{H}^+$	-49
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-113

Todos los microorganismos metanógenos comparten tres características comunes: i) son productores obligados de metano, ya que obtienen toda o la mayor parte de su energía de crecimiento produciendo dicho compuesto. ii) son arqueas, pertenecientes al Phylum *Euryarchaeota* aunque se investiga la posibilidad de estar representadas en otros Phyla: *Bathyarchaeota* (anteriormente grupo misceláneo de Crenarchaeota, MCG) y *Verstraetearchaeota* (anteriormente grupo terrestre diverso Crenarchaeota, TMCG), y iii) son

anaerobios estrictos obligados, lo que restringe su crecimiento a entornos anóxicos, donde catalizan el paso final de la degradación anaerobia de la materia orgánica (Berghuis et al., 2019; Liu y Whitman, 2008).

La bioenergética de la metanogénesis anaeróbica emplea gradientes de protones y sodio generados por bombas primarias para la síntesis de ATP y debido a su complejidad, existe la posibilidad de que todos los metanógenos modernos se originaron de un ancestro antiguo común (Lyu y Liu, 2019).

Estos microorganismos obtienen la energía para su crecimiento de la oxidación de un número limitado de sustratos, entre los que destaca el hidrógeno, acetato y compuestos metilados (Tabla 2) (Söllinger y Urich, 2019). A partir de ello, se establecen cuatro rutas metabólicas principales: la hidrogenotrófica, acetoclástica, metilotrófica y metilotrófica dependiente de hidrógeno (también conocida como metil-reductora).

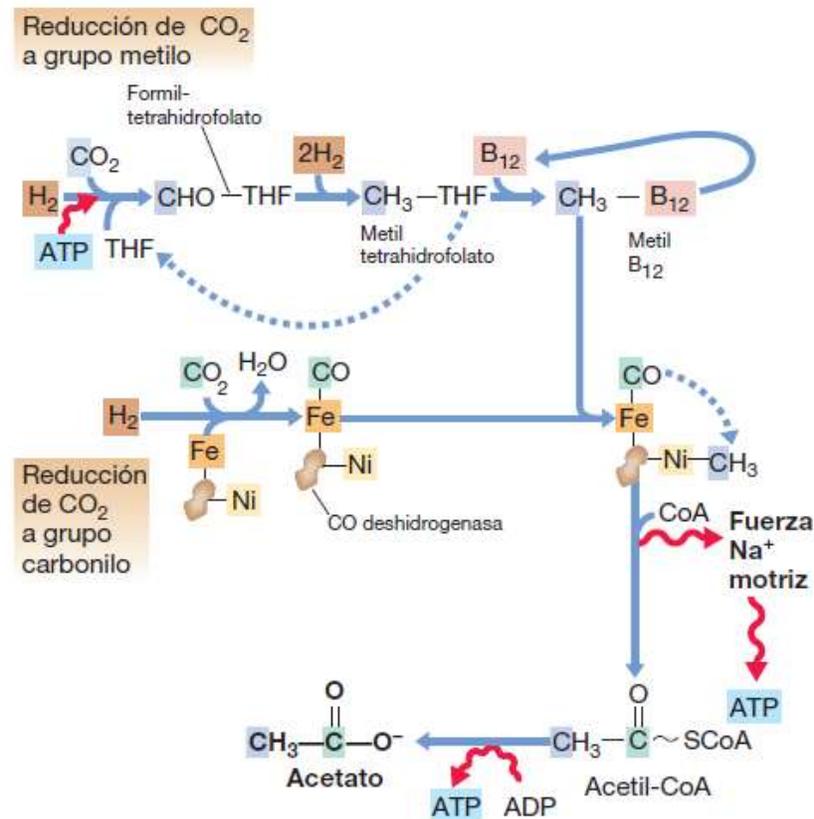
### **2.3.1. Metanogénesis hidrogenotrófica**

La reducción de dióxido de carbono a metano es conocida como *metanogénesis hidrogenotrófica*, ya que el hidrógeno ( $H_2$ ) es el donante de electrones predominante. Alternativamente, el formiato y, más raramente, los alcoholes secundarios, el etanol y el monóxido de carbono también se usan como donantes de electrones (Hedderich y Whitman, 2006).

Gran parte de las especies hidrogenotróficas, son autótrofas y asimilan el dióxido de carbono por la vía acetyl-CoA, también conocida como Wood-Ljungdahl (WLP, por sus siglas en inglés) (Liu y Whitman, 2008).

WLP es una vía relativamente simple en la que dos moléculas de  $CO_2$  se combinan directamente de forma no cíclica para producir acetyl-CoA. La ruta se puede dividir en dos ramas: la rama metilo, donde el  $CO_2$  se reduce consecutivamente a un residuo de metilo unido a cofactor, y la rama carbonilo, donde otra molécula de  $CO_2$  se reduce a un residuo de carbonilo unido a una enzima (Fig. 1). La enzima clave de la vía es la CO deshidrogenasa / acetyl-CoA sintasa, que

cataliza la reducción de  $\text{CO}_2$  a  $\text{CO}$ , así como el siguiente paso, la síntesis de acetil-CoA a partir de los residuos de metilo y carbonilo (Hügler y Sievert, 2011).



**Figura 1.** Reacciones de la vía reductora del acetil-CoA o *Wood-Ljungdahl*. El monóxido de carbono (CO) está unido a un átomo de Fe en la CO-deshidrogenasa y el grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) a un átomo de níquel en un compuesto de níquel orgánico de la CO-deshidrogenasa. Obsérvese cómo la formación del acetil-CoA se acopla a la generación de una fuerza  $\text{Na}^+$  motriz que impulsa la síntesis de ATP, y que el ATP también se sintetiza en la conversión del acetil-CoA a acetato. THF: tetrahidrofolato;  $\text{B}_{12}$ : vitamina B12 en un intermediario unido a la enzima (Modificado de Brock, 2015).

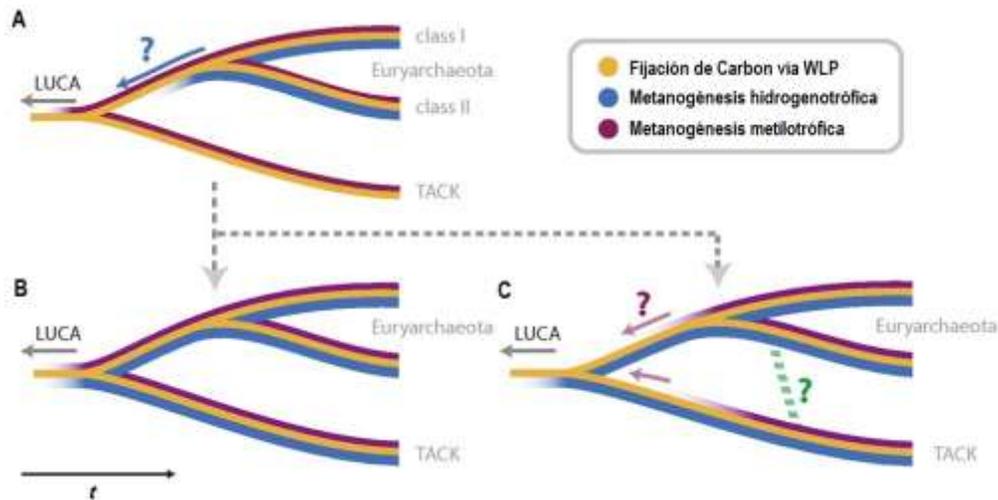
Los metanógenos hidrogenotróficos acoplan dicha ruta a la metanogénesis con el fin de conservar energía (Berghuis et al., 2010). Este acoplamiento se establece mediante N5-metil-tetrahidrometanopterina: coenzima M metiltransferasa (Mtr; también conocida como tetrahidrometanopterina S-metiltransferasa), que transfiere el grupo metilo proveniente de WLP a la coenzima M (Fig. 3). La Mtr utiliza la energía libre de la transferencia de metilo para establecer una fuerza motriz (impulsada por el bombeo de  $\text{Na}^+$ ) a través de la membrana. La metilcoenzima M reductasa reduce luego la metil-coenzima M a metano, utilizando la coenzima

B como donante de electrones. El enlace disulfuro establecido entre estas coenzimas se rompe nuevamente por la heterodisulfuro reductasa (HdrABC/mvhADG) y el complejo de bifurcación de electrones citoplasmáticos genera concomitantemente la ferredoxina reducida requerida para la reducción del dióxido de carbono en el proceso (Costa et al., 2010; Kaster et al., 2011; Thauer et al., 2008a).

El fenómeno de la bifurcación de electrones es un aspecto importante de la conservación de energía (Kaster et al., 2011; Thauer et al., 2008a). Los electrones se acumulan en forma de una flavina reducida de dos electrones en la heterodisulfuro reductasa (Hdr). De cada flavina reducida, un electrón fluye en la dirección exergónica para reducir el heterodisulfuro, y el otro electrón fluye en la dirección endergónica para reducir la ferredoxina (Fd), misma que transporta electrones al primer paso de reducción en la vía. La bifurcación de electrones hace que la vía sea cíclica, y los intermedios reducidos deben reponerse anapleróticamente por la acción de la hidrogenasa *Eha* (Lie et al., 2012; Thauer, 2012).

La vía hidrogenotrófica se considera la ruta metanogénica más extendida, encontrándose en la mayoría de los órdenes metanogénicos descritos a la fecha, y su reciente descubrimiento en miembros del phylum *Verstraetearchaeota*, sugiere que esta vía estaba presente en el último ancestro común de TACK y Euryarchaeota (Fig. 2).

Esta observación es compatible con la hipótesis de que la metanogénesis metilotrónica es una adaptación tardía y, además, refuerza la noción de que el último ancestro común universal (LUCA) era un metanógeno reductor de dióxido de carbono (Berghuis et al., 2019).



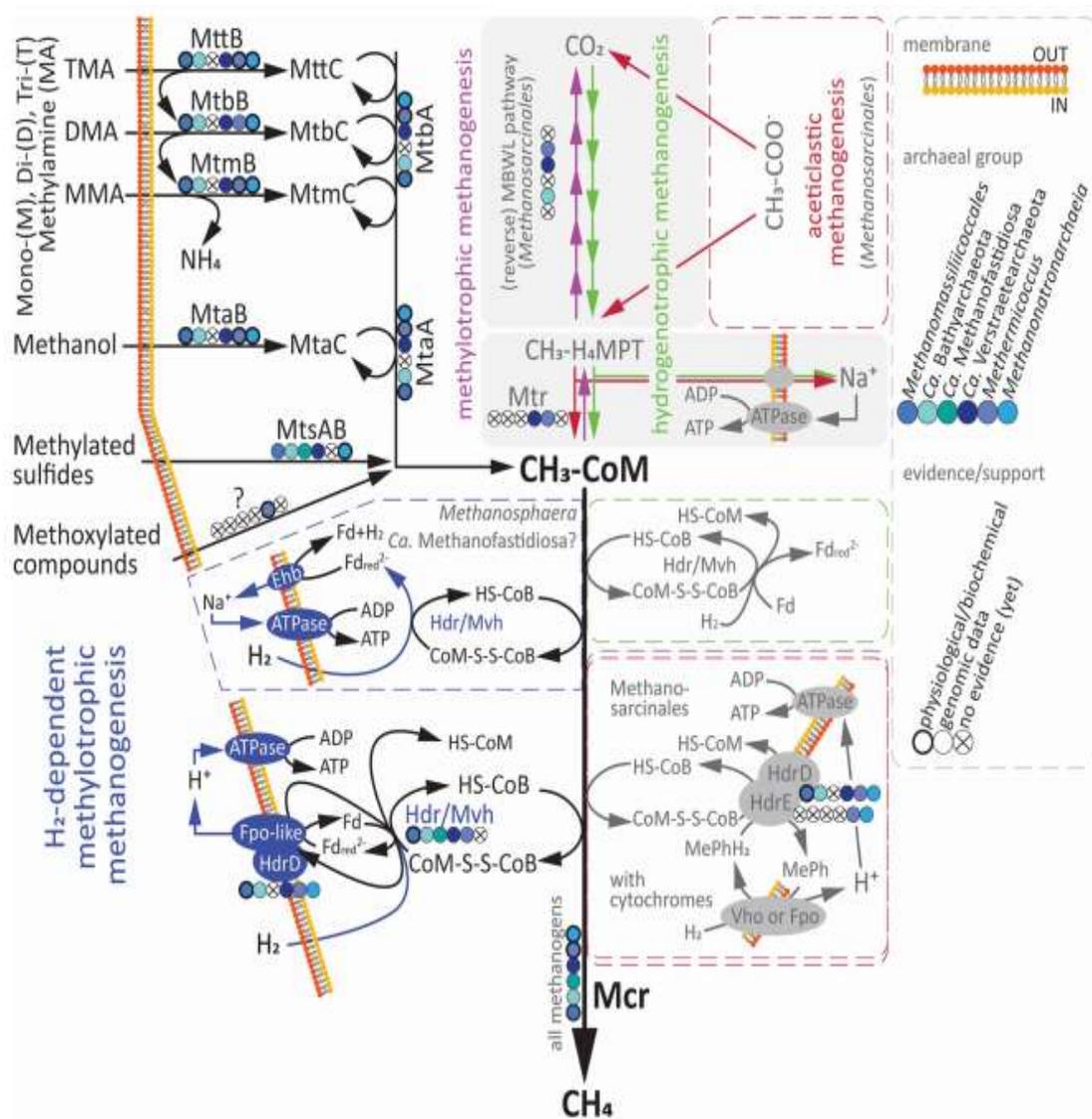
**Figura 2.** Posible evolución de la metanogénesis en Arquea. (A) La metanogénesis hidrogenotrófica (o reductora de dióxido de carbono) (azul) se observó previamente exclusivamente en el superphylum Euryarchaeota, mientras que la metanogénesis metilotrófica (púrpura) se encontró también en el superphylum TACK. (B) El descubrimiento de la vía hidrogenotrófica completa en *Verstraetearchaeota*, un miembro del superphylum TACK, sugiere que esta vía estaba presente en el último ancestro común de *Verstraetearchaeota* y *Euryarchaeota*. (C) Esta propuesta apoya también la hipótesis de que la metanogénesis metilotrófica es una adaptación posterior [incluida la posible transferencia horizontal de metiltransferasas (línea discontinua verde)] de la forma reductora de CO<sub>2</sub> más primitiva, y refuerza aún más la noción de que LUCA era un metanógeno reductor de dióxido de carbono (Modificado de Berghuis et al. 2019).

### 2.3.2. Metanogénesis acetoclástica

En la metanogénesis acetoclástica, el acetato (CH<sub>3</sub>-COO<sup>-</sup>) se divide y el grupo carboxilo se oxida a dióxido de carbono mientras que el grupo metilo se reduce a metano (CH<sub>4</sub>) en dos reacciones enzimáticas, homólogas a los dos últimos pasos de la vía hidrogenotrófica.

El destino del acetato en un entorno metanogénico depende en gran medida de las condiciones fisicoquímicas, como la temperatura, el pH, la salinidad y la presencia de compuestos inhibidores, por ejemplo, amonio a un pH circundante y a una temperatura baja o moderadamente alta, el acetato se degrada directamente por las arqueas metanogénicas. Solo dos géneros de metanógenos son capaces de crecer en acetato: *Methanotherix* (antes *Methanosaeta*) y *Methanosarcina* de modo que es más usual la degradación sintrófica del acetato. Esta última es particularmente importante en condiciones en las que los metanógenos acetotróficos no pueden crecer bien, como suele ser el caso de entornos con una alta

concentración de amonio, alta temperatura (por encima de 60°C) y alto nivel de pH y/o salinidad (McGenity y Sorokin, 2019).



**Figura 3.** Descripción general de las vías de metanogénesis encontradas en Arquea: hidrogenotrófica, acetoclástica, metilotrófica y la recién descrita: metilotrófica dependiente de hidrógeno. La evidencia fisiológica, bioquímica o genómica de enzimas específicas se indica con círculos de colores. El código de color resalta partes seleccionadas de rutas específicas de metanogénesis, así como la presencia de enzimas dentro de linajes de arquea seleccionados. Tomado de Söllinger y Ulrich, (2019).

Pese a que se trata de la ruta metanogénica menos común, pues se atribuye a sólo dos géneros del orden *Methanosarcinales*, la vía acetoclástica representa aproximadamente dos tercios de la producción de metano biogénico a nivel mundial (Liu y Whitman, 2008a).

Ahora bien, existen dos tipos de metanógenos que utilizan compuestos C1 metilados (metanol, metilaminas y tioles metilados) como sustrato: los metilótrofos y los metilotróficos dependientes de hidrogeno (metil-reductores).

### **2.3.3. Metanogénesis metilotrófica**

La metanogénesis metilotrófica clásica es realizada por metanógenos que poseen citocromos en la membrana celular de representantes de la familia *Methanosarcinaceae*. En ella, los grupos metilo de compuestos metilados como metanol, metilaminas y sulfuros metilados se transfieren de proteínas corrinoideas específicas del sustrato a ácido 2-mercaptoetanosulfónico (CoM-HS) y luego a Coenzima M para finalmente reducirse a metano (Fig. 3).

Esta vía implica la dismutación (reacción en la que una sustancia se oxida y reduce simultáneamente, dando dos productos diferentes) de los compuestos metilados, de modo que uno de los grupos metilo se oxida a dióxido de carbono (en las mismas reacciones que constituyen la metanogénesis hidrogenotrófica, pero en dirección inversa) generando  $F_{420}H_2$  y ferredoxina reducida, mismos que participan en la reducción de los grupos metilo restantes a metano (Welte y Deppenmeier, 2014).

Los metanógenos metilotróficos son los principales contribuyentes a la producción de metano en sedimentos marinos donde la abundancia de metanógenos hidrogenotróficos y acetoclasticos es superada por bacterias reductoras de sulfato. Además, los metanógenos metilotróficos también se han aislado del tracto gastrointestinal de animales y entornos extremos, como por ejemplo tapetes microbianos hipersalinos (García-Maldonado et al., 2012; Söllinger y Urich, 2019a)

### **2.3.4. Metanogénesis metilotrófica dependiente de hidrogeno**

Esta vía, también conocida como metanogénesis metil-reductora, atrae un interés considerable desde el punto de vista teórico. Aunque su ocurrencia también está ligada a la presencia de compuestos metilados, a diferencia de los metanógenos metilotróficos convencionales, estos no pueden desproporcionar el sustrato y dependen estrictamente de la donación de electrones de hidrógeno y/o formiato para poder reducir el grupo metilo a metano (Kallistova et al., 2020).

Su característica distintiva es la eliminación completa de los seis genes de la vía metanogénica superior. Al mismo tiempo, expresan varias metiltransferasas específicas de C1 y poseen un complejo citoplasmático hidrogenasa/heterodisulfuro reductasa, MvhADG / HdrABC (Lang et al., 2015).

El grupo de los metanógenos metil-reductores incluye las especies *Methanosphaera stadtmanae* (Orden Methanobacteriales) y *Methanomicrococcus blatticola* (Methanosarcinales), la clase extremadamente halo(natrono)filica recientemente descubierta "*Methanonatronarchaeia*", así como miembros del orden *Methanomassiliicoccales* y *Methanofastidiosa*. (Lang et al., 2015; Sorokin et al., 2017).

Aunque todos los microorganismos descritos anteriormente pertenecen al superphylum *Euryarchaeota*, recientemente, los genes que codifican las enzimas clave de la metanogénesis reductora de metilo se identificaron en genomas de arqueas que corresponden a los filos "*Bathyarchaeota*" y "*Verstraetearchaeota*" (Ca. "*Methanomethylicus*" y Ca. "*Methanosuratus*") (Evans et al., 2015; Vanwonterghem et al., 2016), contradiciendo la hipótesis de que el metabolismo del metano tuvo un origen temprano en la evolución de *Euryarchaeota* (Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006).

La creciente diversidad de metanógenos metilotróficos dependientes de hidrogeno apunta a que este metabolismo se ha pasado por alto en gran medida y mientras su origen y relación evolutiva con la metanogénesis hidrogenotrófica siguen sin estar claros, el hecho de que sea un metabolismo más simple, que requiere menos genes que la metanogénesis hidrogenotrófica dependiente de CO<sub>2</sub>, podría sugerir su origen más temprano (Borrel et al., 2019).

En 2020, la anotación de genomas a partir de ensamblajes de metagenomas (MAGs) en manglares, evidenció que tanto *Methanomicrobiales* como miembros de *Methanosarcinales* poseen genes que codifican enzimas conservadas que son centrales de la metanogénesis hidrogenotrófica, incluida la formilmetanofurano deshidrogenasa (Fwd), la formilmetanofurano-tetrahidrometanopterina N-formiltransferasa (Ftr), la metenil-H<sub>4</sub>MPT ciclohidrolasa (Mch), la metilentetrahidrometanopterina deshidrogenasa (Mtd), metilen-H<sub>4</sub>MPT reductasa (Mer), la coenzima M metiltransferasa (Mtr) y la metil-coenzima M reductasa (Mcr). *Methanosarcinales*,

mostró además potencial para la metanogénesis acetoclástica al contener genes que codifican acetil-CoA sintasa (Acs), monóxido de carbono deshidrogenasa (Cdh), Mtr y Mcr, enzimas clave en la utilización de acetato como sustrato para la metanogénesis y, en conjunto con *Methanofastidiosales* y *Methanomassiliicoccales*, genes que codifican metiltransferasas específicas de sustrato para múltiples compuestos de metilo: la tiol metilado coenzima M metiltransferasa (Mts), metanol-CoM-metiltransferasa (Mta), monometilamina metiltransferasa (Mtm), dimetilamina metiltransferasa (Mtb) y trimetilamina metiltransferasa (Mtt), mismas que son fundamentales para la producción de metano a través de la vía metilotrónica (Zhang et al., 2020).

Si bien cada ruta comienza de manera distinta, todos culminan con la reacción de la metilcoenzima M ( $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ ) con una segunda coenzima tiol, llamada "coenzima B" (CoB-SH), para formar metano y un disulfuro mixto (también llamado "heterodisulfuro", CoM-SS-CoB) de la coenzima M y la coenzima B (Fig. 3). Esta reacción es catalizada por la metilcoenzima M reductasa (Mcr), una proteína Ni-corrinoide que está presente en todos los tipos de metanogénesis, lo que la convierte en la enzima clave en la metanogénesis (Thauer et al., 2008).

La metilcoenzima M reductasa es una enzima muy inusual, y muchas características de su ensamblaje, maduración y activación son poco conocidas. *In vitro*, su actividad es muy inestable, por lo que es difícil de estudiar (Lyu et al., 2018) sin embargo, a nivel molecular el trabajo de Luton et al. (2002) reveló que la filogenia de los metanógenos establecida a partir del gen de la metil-coenzima M reductasa (*mcrA*) y su isoenzima (*mrtA*) es congruente con los árboles filogenéticos basados en secuencias del gen estructural 16S ARNr (Lueders et al., 2001). Este hallazgo hizo de los oligonucleótidos específicos para la secuenciación de genes funcionales *mcrA* y *mrtA*, la herramienta ideal en el estudio de comunidades microbianas en las que los metanógenos son una minoría en la población general de arqueas (Narihito y Sekiguchi, 2017) gracias a su alto grado de conservación y su limitada ocurrencia derivada quizá, de las restricciones funcionales de actividad catalítica de la enzima (Hallam et al., 2003).

#### **2.4. Diversidad y distribución de arqueas metanógenas**

Por mucho tiempo, los metanógenos estuvieron siendo asignados al superphylum *Euryarchaeota*, y divididos en dos grandes clados, que se denominaron metanógenos de Clase I

(*Methanococcales*, *Methanopyrales* y *Methanobacteriales*) y metanógenos de Clase II (*Metanomicrobiales*, *Methanocellales* y *Methanosarcinales*) (Baptiste et al., 2005). Dicha taxonomía está respaldada por secuencias del gen 16S ARNr, así como por una serie de propiedades fisiológicas, por ejemplo sustratos empleados para la metanogénesis, requerimientos nutricionales, morfologías y estructuras de sus envolturas celulares (Lyu and Liu, 2019b)

A partir del avance en las tecnologías de secuenciación, nuevos órdenes de metanógenos bien establecidos han sido incorporados en este grupo de microorganismos de los que destaca *Methanofastidiosa* y *Methanomassiliicoccales*; ambos incluidos en el filo *Euryarchaeota*, pero no en los metanógenos de clase I o II (Zhang et al., 2020). Asimismo, como se comentaba anteriormente, se prevé que la vía de metanogénesis esté presente en los phyla *Bathyarchaeota* y *Verstraetearchaeota* recientemente propuestos, sugiriendo que la diversidad de metanógenos puede ser mayor que la anteriormente exceptuada.

De las vías metanogénicas descritas, la mayoría de los metanógenos de Clase I/II pueden crecer reduciendo el CO<sub>2</sub> en metano utilizando hidrogeno como donador de electrones, tal es el caso de *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanobacteriales*, *Metanomicrobiales*, *Methanocellales* y *Methanosarcinales* que emplean la vía hidrogenotrófica (Liu y Whitman, 2008b). *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (ambos del Orden *Methanosarcinales*) destacan como los únicos metanógenos acetoclasticos conocidos a la fecha (Ferry, 2011) y de los grupos que integran el metabolismo metilotrófico se distinguen los *Methanosarcinales* que poseen citocromos y los que carecen de ellos (Lang et al., 2015) como es el caso de *Methanosphaera* (*Methanobacteriales*), *Methanofastidiosa* y *Methanomassiliicoccales* (Borrel et al., 2014a; Gaci et al., 2014; Zhang et al., 2020).

Independientemente de la vía metanogénica codificada, todos los miembros de los metanógenos de Clase I y II poseen la rama metil tetrahidrometanopterina (H<sub>4</sub>MPT) de la vía Wood-Ljungdahl, el complejo N5-metiltetrahidrometanopterina-coenzima M metiltransferasa (MtrABCDEFGH o MTR) y el complejo de la metilcoenzima M-reductasa (McrABG o MCR) (Borrel et al., 2016). Sin embargo, una característica sorprendente de los grupos metanógenos recientemente descritos es la ausencia del complejo MTR, una ruta WLP parcial o ausente y la

presencia de metiltransferasas específicas para el uso de compuestos metilados (Borrel et al., 2019).

Tanto la literatura como la vasta cantidad de secuencias depositadas en bases de datos demuestra que las arqueas metanógenas son un constituyente común de ambientes anaeróbicos en todo el mundo, desde sedimentos de agua dulce a hipersalinos, de suelos ácidos a alcalinos, de tractos gastrointestinales animales a arrozales, biorreactores industriales y depósitos ricos en hidrocarburos (Evans et al., 2015). Ahora se sabe que la estructura y composición de la comunidad microbiana metanógena y las vías metabólicas que la acompañan depende en gran medida del entorno ecológico en el que se encuentra (Zhang et al., 2020).

En humedales, principal fuente de emisión natural de metano, el orden *Methanomassiliicoccales* contribuye a la alta diversidad de metanógenos entre los que se incluyen miembros de *Methanosarcinales*, *Methanobacterales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* y *Methanocellales* (Yavitt et al., 2012; Tveit et al., 2013; Söllinger et al., 2016). *Methanofastidiosa*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* fueron identificados como los cuatro metanógenos dominantes en sedimentos de manglares (Zhang et al., 2020). En sedimentos marinos, sobresalen miembros del orden *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanomicrobiales* hidrogenotróficos, *Methanosaeta* acetoclasticos y *Methanosarcinales* metilotróficos (Lang et al., 2015; Katayama et al., 2016; Carr et al., 2018). Entre los metanógenos hidrogenotróficos y acetoclasticos que dominan en sedimentos de lagos salinos se encuentran miembros del orden *Methanococcoides* y *Methanomicrobiales*: *Methanoculleus* y *Methanogenium*. En sedimentos oligohalinos de agua dulce abundan los *Methanosarcinales*, y algunos miembros de *Methanomassiliicoccales*, mientras que en sedimentos de agua dulce la contribución de *Methanosarcinales* acetoclásticos a la metanogénesis es mayor a la de *Methanobacterales* y *Methanomicrobiales* hidrogenotróficos (Conrad, 1999; Dong et al., 2006; Liu et al., 2016; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2020).

## **2.5 Linajes metanógenos metilotróficos dependientes de hidrógeno**

Hasta hace poco, era escasa la atención prestada a la metanogénesis metilotrófica, dada su limitada incidencia con respecto a la vía hidrogenotrófica (que ocurre dentro de seis de las ocho

órdenes de arqueas metanogénicas válidamente descritas) y su menor relevancia ecológica respecto a la vía acetoclástica. Sin embargo, esta percepción cambió con el descubrimiento guiado por la metagenómica de nuevos taxones y su capacidad para producir metano a partir de la reducción de compuestos metilados, empleando al hidrógeno como donador de electrones externo. Entre los que se incluye el grupo *Methanomassiliicoccales*, *Candidatus 'Methanofastidiosa'*, y miembros del phylum arqueal *Bathyarchaeota* y *Verstraetearchaeota* (Evans et al., 2015; Nobu et al., 2016; Vanwonterghem et al., 2016).

Cabe señalar que, aunque la reducción de diferentes compuestos metilados empleando hidrógeno para la metanogénesis está fuertemente soportada en estos grupos, se presume también que los miembros de *Bathyarchaeota* y *Verstraetearchaeota* pueden emplear además sustratos complejos como el lactato. Estos hallazgos no sólo conducen a la propuesta de nuevas clases de metanógenos sino también al establecimiento de taxones metanogénicos fuera de *Euryarchaeota*.

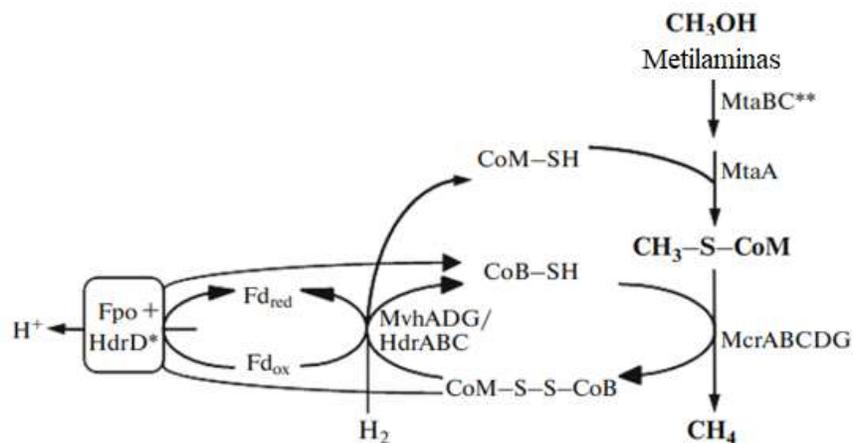
### **2.5.1. Methanomassiliicoccales**

*Methanomassiliicoccales* corresponde a un nuevo orden de metanógenos que han sido identificados en una gran variedad de ambientes naturales tales como sedimentos marinos y lacustres, humedales, manglares, así como de sistemas digestivos de animales (insectos, rumiantes, humanos) (Söllinger y Urich, 2019a).

El análisis de los primeros genomas de *Methanomassiliicoccales* aislados/enriquecidos del tracto gastrointestinal humano mostró que no están relacionados con ningún metanógeno Clase I y Clase II previamente conocido, y dejó entre ver su asociación con un gran clado de linajes no metanogénicos, los *Thermoplasmatales* (Borrel et al., 2013).

Estos microorganismos se distinguen de todos los metanógenos conocidos anteriormente por la ausencia total de la vía metabólica *Wood-Ljungdahl* y el complejo MTR (Borrel et al., 2013; Lang et al., 2015; Söllinger et al., 2016). Para la metanogénesis, utilizan metiltransferasas y proteínas corrinoideas que permiten la transferencia de grupos metilo del metanol, las aminas metiladas y el sulfuro de dimetilo a ácido 2-mercaptoetanosulfónico (HS-CoM).

Al igual que en los metanógenos de Clase I y II sin citocromos, es probable que el complejo la heterodisulfuro reductasa (Hdr) y el complejo de hidrogenasa no reductora  $F_{420}$  (Mvh) también genere ferredoxina reducida a través de la bifurcación de electrones basada en flavina (Fig.4) (Borrel et al., 2014b). La conservación de energía implica potencialmente un acoplamiento adicional entre ferredoxina y heterodisulfuro, donde la  $Fd_{red}^{2-}$  generada por Hdr/Mvh reduce un segundo heterodisulfuro. Esta reacción probablemente es operada por la asociación de una hidrogenasa  $F_{420}H_2$  truncada (Fpo) y una segunda heterodisulfuro reductasa (HdrD), y está acoplada a la generación de un gradiente quimiosmótico explotable por una ATP sintasa (Lang et al., 2015). Este proceso representa una forma novedosa de acoplar la metanogénesis a la conservación de energía y su descripción colocó a este grupo el centro de atención, motivando la exploración de una nueva vía de metanogénesis conocida como metilotrófica dependiente de hidrógeno.



**Figura 4.** Reacciones de metanogénesis a través de la vía metilotrófica dependiente de hidrógeno en miembros del orden *Methanomassiliicoccales* (reproducido de Lang et al., 2015). Designaciones y abreviaturas: \*, enzimas asociadas a la membrana; \*\*, metiltransferasas específicas de sustrato que dependen del sustrato de crecimiento, por ejemplo: metanol-CoM-metiltransferasa (Mta); monometilamina metiltransferasa (Mtm); dimetilamina metiltransferasa (Mtb); trimetilamina metiltransferasa (Mtt); metilcobamida-CoM-metiltransferasa (MtbA); Fdred, ferredoxina reducida; Fdox, ferredoxina oxidada; Fpo,  $F_{420}H_2$ : complejo de tipo fenazina oxidoreductasa; Hdr, heterodisulfuro reductasa; Mcr, metil-coenzima M reductasa; Mvh, hidrogenasa no reductora de  $F_{420}$ .

Con base a la información del gen 16S ARNr y el gen funcional *mcrA*, este orden abarca al menos dos linajes a nivel familia: *Candidatus 'Methanomethylophilaceae'* (Gaci et al., 2014) y *Methanomassiliicoccaceae* (Lino et al., 2013) frecuentemente asociados a dos tipos de hábitat

específico; el primero, con el tracto digestivo de los animales y el segundo, a entornos terrestres y acuáticos (de la Cuesta-Zuluaga et al., 2020).

Entre los representantes de *Ca. "Methanomethylophilaceae"* se encuentra *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomethylophilus alvus*, *Methanoplasma termitum* así como la cepa ISO4-H5 (Borrel et al., 2014; Lang et al., 2015; Y. Li et al., 2016; Borrel et al., 2017); todos ellos asociados al tracto gastrointestinal de animales y los cuales ha sido posible crecer en laboratorio.

El segundo grupo, *Methanomassiliicoccaceae*, está mucho menos documentado y comprende principalmente miembros detectados únicamente por métodos de secuenciación independientes de cultivo en ecosistemas terrestres y acuáticos, como por ejemplo sedimentos de fondo marino, humedales y manglares (Li et al., 2016; Söllinger et al., 2016; Z et al., 2014; Zhang et al., 2020). Cabe mencionar que, los conocimientos de ecología y fisiología que se tienen de este clado en particular, se limitan a el ensamble de unos cuantos genomas a partir de metagenomas y al cultivo de algunas cepas (Dridi et al., 2012; Söllinger et al., 2016; Söllinger y Urich, 2019a; Zhang et al., 2020).

### **2.5.2. Methanofastidiosales**

Así como los *Methanomassiliicoccales*, los *Methanofastidiosales* se distinguen de los metanógenos tradicionales de Clase I y Clase II por la falta de genes que codifican enzimas para la reducción convencional de dióxido de carbono, carecer del complejo MTR y emplear hidrógeno como agente reductor para la metanogénesis.

Los miembros de *Methanofastidiosa* pertenecen al clado de microorganismos no cultivados WSA2 que durante mucho tiempo se pensó empleaba H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> o formiato para la producción de metano (Hendrickson et al., 2004; Lyu y Liu, 2019b; Nakamura et al., 2013). Sin embargo, análisis de genómica comparativa entre WSA2 y clados de *Euryarchaeota* mostraron una baja superposición de este grupo con los géneros de *Euryarchaeota* tanto metanogénicos (6–15%) como no metanogénicos (2–15%). En ellos, los genes compartidos entre los géneros WSA2 con *Euryarchaeota* correspondían principalmente a genes de mantenimiento, incluidas proteínas ribosómicas, genes de biosíntesis y genes específicos de Arquea (por ejemplo, histona, termosoma y ATP sintasa). WSA2 y los clados metanogénicos, por otra parte, compartieron

genes que codifican proteínas marcadoras de metanogénesis, como es el caso de Mcr. Curiosamente, WSA2 comparte la vía de la metilmalonil-CoA con géneros no metanogénicos, que no albergan genomas metanogénicos conocidos. El hallazgo de Mcr, su composición genética única y detección inusual de la vía metilmalonil-CoA sugirieron que WSA2 podría tener capacidades metanogénicas singulares, pues carecía de la vía convencional de reducción de CO<sub>2</sub> a metano (Wood-Ljungdahl) y de la acetil-CoA sintasa (de modo que ni el dióxido de carbono ni el acetato podrían ser empleados como sustrato). Aunado a esto, algunas metiltransferasas esenciales para el metabolismo de metanol y metilaminas tampoco pudieron ser identificadas (Nobu et al., 2016). Sin embargo, los genomas albergan genes para el complejo de heterodisulfuro reductasa (hdrABC) / [Ni-Fe] hidrogenasa (mvhADG), clave para la reducción de heterodisulfuro coenzima B coenzima M (CoB-S-S-CoM) y para la oxidación del H<sub>2</sub> (Zhang et al., 2020), sugiriendo con ello que realizan una metanogénesis metilotrófica independiente de citocromos como todos los metanógenos distintos de *Methanosarcinales* (Nobu et al., 2016; Thauer et al., 2008a).

Los miembros de *Methanofastidiosa* están ampliamente distribuidos en entornos naturales, tales como sedimentos marinos y de agua dulce, aguas subterráneas contaminadas y biorreactores (Cheng et al., 2012; Dhillon et al., 2005; Wilkins et al., 2015). Asimismo, no requieren condiciones hidrotermales particulares pero la disponibilidad de hidrógeno y metiltioles puede ser el factor clave para la ocurrencia y distribución ambiental de este grupo (Nobu et al., 2016).

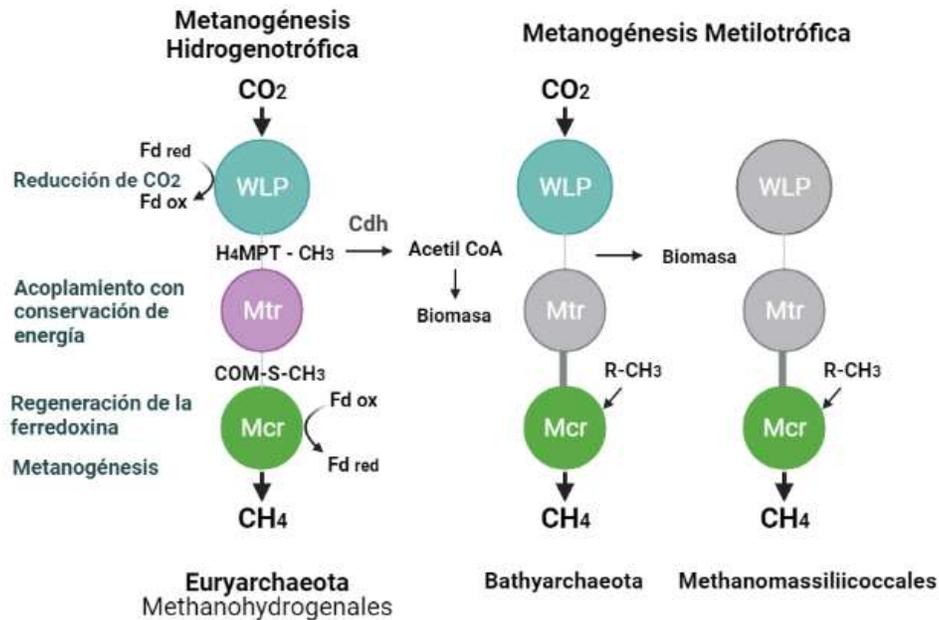
### **2.5.3. Bathyarchaeota**

El recién propuesto phylum *Bathyarchaeota* representa un grupo filogenéticamente diverso de microorganismos asociados a TACK (Gagen et al., 2013; Kubo et al., 2012) con distribución en una amplia gama de entornos incluyendo sedimentos marinos y continentales.

La alta abundancia de secuencias del gen que codifica para la subunidad 16S ARNr Bathyarchaeotal así como biomarcadores de lípidos dentro de las zonas de transición sulfato-metano condujo a la especulación de que los miembros de este linaje podrían estar involucrados en la oxidación anaerobia “disimilatoria” de metano, acoplada a la asimilación de

carbono orgánico (Biddle et al., 2006), sin embargo, aún quedaban algunas discrepancias energéticas e isotópicas sin resolver.

Más tarde, la secuenciación casi completa de dos genomas (BA1 y BA2) pertenecientes a este *Phylum* realizada por Evans y col. (2015) reveló el hallazgo de homólogos divergentes a los genes necesarios para el metabolismo del metano, incluidos los que codifican el complejo metilcoenzima M reductasa (MCR).



**Figura 5.** Diferentes configuraciones para el funcionamiento asociado o independiente de la ruta Wood-Ljungdahl (WLP) de Arquea y la metanogénesis. Los complejos o vías enzimáticas faltantes están sombreados en gris. Se muestran los siguientes: metanogénesis reductora de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) presente en los *Metanohydrogenales*, así como metanógenos de clase I y clase II sin citocromos (izquierda); metanogénesis por reducción de compuestos metilados empleando hidrógeno, como se infiere en *Bathyarchaeota* y un enlace potencial con WLP en ausencia de MTR (centro); y metanogénesis por reducción de compuestos metilados usando hidrógeno como donador de electrones, como se propone en *Methanomassiliicoccales* (derecha) (Modificado de Berghuis et al., 2019).

La reconstrucción metabólica del genoma BA1 reveló la presencia de muchos genes en la vía *Wood-Ljungdahl* y genes clave asociados con el metabolismo del metano de las arqueas (Fig. 5). Su genoma contiene además genes para la metanogénesis a partir de sulfuros de metilo (mtsA), metanol (mtbA) y aminas metiladas (mtaA, mttBC, mtbBC), así como tres subunidades de mtrH, cada una colocada con una proteína corrinoide. La presencia de estos genes sugiere una potencial vía metanogénica basada en la utilización de compuestos metilados, similar a la

encontrada en metanógenos metilotróficos dependientes de  $H_2$  del orden *Methanomassiliicoccales*. Asimismo, doce metiltransferasas con gran similitud entre sí, pero divergentes de las metiltransferasas conocidas también fueron identificadas, lo que sugiere que este microorganismo puede utilizar compuestos metilados adicionales (Evans et al., 2015).

#### 2.5.4. Verstraetearchaeota

Aunque la capacidad para llevar a cabo metanogénesis metil-reductora es la característica metabólica clave de todos los miembros de *Verstraetearchaeota* predicha en base al análisis de sus genomas (Vanwonterghem et al., 2016), este grupo no presenta una asociación sólida con ningún otro linaje metanogénico en los árboles filogenéticos que se han construido a partir del gen de la subunidad 16S ARNr y *mcrA*.

De acuerdo con análisis filogenéticos basados en el gen funcional *mcrA*, los miembros de *Verstraetearchaeota* se agruparon monofiléticamente fuera de los linajes metanogénicos pertenecientes al filo *Euryarchaeota* y *Bathyarchaeota* hasta ese entonces reconocidos. Mientras que el árbol construido a partir de genes de 16S ARNr los asociaba con clones ambientales que pertenecían a TMCG, que a la fecha no tenía representación genómica (Vanwonterghem et al., 2016).

El mismo trabajo destacó que los miembros de este linaje poseen genes clave asociados con la metanogénesis metilotrófica, entre los que se incluye el complejo completo de metil-coenzima M reductasa (MCR; *mcrABG* y genes auxiliares *mcrCD*) con sitios de unión conservados para los cofactores coenzima M, coenzima B y  $F_{430}$  y genes necesarios para la producción de metano a partir de metanol (*mtaA*) y metanotiol (*mtsA*). Además, se ha identificado en sus genomas, un complemento variable de genes para la utilización de metilaminas (*mtbA*, *mtmBC*, *mtbBC*, *mttBC* y *ramA*) y la ausencia de genes involucrados en la metanogénesis hidrogenotrófica y acetoclástica, lo que es compatible con la metanogénesis metilotrófica dependiente de hidrogeno obligada.

Otro aspecto novedoso respecto a *Verstraetearchaeota*, es que además del metabolismo del metano, posee una serie de genes y complejos enzimáticos que le permitirían utilizar azúcares como fuente de carbono y generar acetyl-CoA a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

y piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (Por) y conduce a una posible producción de energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato. Aunque esto es inusual para los microorganismos involucrados en el metabolismo del metano, la capacidad de realizar fermentaciones complejas también se ha detectado en Bathyarchaeota y podría sugerir una diversificación de sustrato para este grupo de arqueas metanógenas (Vanwonterghem et al., 2016).

### 3. JUSTIFICACION

La investigación de arqueas metanógenas se basó inicialmente en técnicas de cultivo de laboratorio. La escasa importancia otorgada a este tipo de microorganismos en los tapetes microbianos fue minada por la aparente dominancia de otros gremios. Por mucho tiempo, el estudio de los tapetes microbianos modernos giró en torno a la actividad fotosintética originada por diatomeas y cianobacterias, la elevada tasa de producción de hidrógeno durante las condiciones de oscuridad y anoxia (en un proceso que depende en gran medida de la fotosíntesis oxigénica), la fijación nocturna de nitrógeno atmosférico y la degradación de la materia orgánica principalmente por fermentación y actividad reductora de sulfato; subestimando así la importancia de la metanogénesis en este tipo de microsistemas.

Dado que, para comprender el funcionamiento de una comunidad microbiana, se debe conocer bien y en detalle el microambiente físico y químico en el que viven los microorganismos, uno de los objetivos de este trabajo es comprender y lograr explicar la composición y estructura de las comunidades de Bacteria y Arquea en dos sitios con diferente salinidad; partiendo del supuesto de que en condiciones de hipersalinidad, semejantes a las que caracterizan los tapetes microbianos desarrollados bajo los estanques de operación de la empresa salinera Exportadora de Sal S.A., la producción de metano es favorecida por sustratos denominados “no competitivos” entre bacterias sulfato reductoras y metanógenas, tales como las metilaminas, el metanol y el dimetil sulfuro (Cadena et al., 2018; García-Maldonado et al., 2018, 2014, 2012; Kelley et al., 2015).

Por otra parte, información genómica reciente de arqueas cultivables y no cultivables han contribuido considerablemente al conocimiento del potencial metabólico y las funciones ecológicas de estos microorganismos en los ciclos biogeoquímicos globales, sin embargo, aún son muchas las interrogantes con relación a la diversidad filogenética y funcional de microorganismos de baja abundancia relativa, como es el caso de los involucrados en la producción anaerobia de metano, dentro de su nicho ambiental y sus posibles relaciones sintróficas con otros organismos.

Más allá de su baja abundancia relativa, la presencia de arqueas metanógenas metilotróficas dependientes de hidrógeno en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos, aún no se ha evaluado de forma sistemática. Este trabajo busca ampliar el conocimiento acerca de la distribución ambiental de este tipo de microorganismos y las posibles interacciones que tienen con otros linajes microbianos, buscando dar respuesta a la pregunta: *¿Existen arqueas metanogénicas metilotróficas dependientes de hidrógeno en los tapetes microbianos que integran los estanques de operación de Exportadora de Sal S. A.?*

#### 4. HIPÓTESIS

Dado que el rápido desarrollo de técnicas de secuenciación masiva, la metagenómica y la genómica de células individuales, han revolucionado los métodos de investigación aplicables y aceleraron la investigación microbiana, en los últimos años mucho se ha profundizado en la comprensión respecto al gran repertorio metabólico y la diversidad genómica del dominio Arquea, conduciendo a la descripción una gran cantidad de linajes novedosos y al planteamiento de nuevas interrogantes respecto la composición, estructura y estabilidad de las comunidades microbianas, así como a la actividad y función de cada uno de los gremios que las constituyen.

En este sentido y pese a que la filogenia, fisiología y bioquímica de las arqueas metanógenas se han estudiado de manera extensa, en años recientes importantes descubrimientos se hicieron con relación a la metanogénesis. Particularmente, se describieron nuevos Ordenes capaces de emplear simultáneamente compuestos metilados e hidrógeno para la metanogénesis en una vía denominada metil-reductora. Esta vía, que difiere de los procesos bien conocidos de metanogénesis hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica clásica, no ha sido evaluada de forma sistemática en los tapetes microbianos hipersalinos de Exportadora de Sal S.A, Guerrero Negro.

Por años, estos tapetes microbianos han sido relevantes para el estudio de ecosistemas estratificados al proporcionar valiosa información sobre la estructura y el flujo de bioelementos dentro de su microambiente, así como por poseer estrategias ecofisiológicas que permiten sustentar la vida en una amplia gama de condiciones ambientales, sin embargo y como se mencionó anteriormente, aún son muchas las interrogantes que existen en cuanto a la biosíntesis del metano y los microorganismos en ella involucrados en este tipo de entornos.

En los ambientes hipersalinos, diversos estudios han evidenciado que la trimetilamina y el metanol son sustratos ecológicamente relevantes al jugar 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; Kelley et al., 2015). El hallazgo de linajes filogenéticos, basados en el gen *mcrA*, de metanógenos hidrogenotróficos putativos reportados por García-Maldonado et al. (2014) en tapetes microbianos de Exportadora de Sal, S.A., es lo

que alienta a llevar a cabo la exploración y caracterización de esta localidad bajo el supuesto de una metanogénesis metilotrófica dependiente de hidrógeno.

Siendo la salinidad uno de los factores con mayor influencia en la distribución de arqueas metanógenas dentro de una comunidad microbiana, se espera que el estudio de la estructura y composición de las comunidades microbianas que integran los tapetes microbianos de dos sitios con diferente salinidad en Exportadora de Sal S.A. Guerrero Negro, aumente nuestro conocimiento sobre estos complejos sistemas microbianos, su éxito ecológico y la extensa gama de actividades metabólicas que en ellos convergen; valiéndonos para ello del análisis bioinformático de amplicones del gen que codifica para la subunidad 16S ARNr integrado con el análisis estadístico de variables ambientales estimadas en los sitios de muestreo.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Ampliar el conocimiento sobre la estructura y composición de la comunidad de Bacteria y Arquea en tapetes microbianos hipersalinos con énfasis en arqueas metanógenas metilotróficas dependientes de hidrógeno de dos sitios con diferente salinidad.

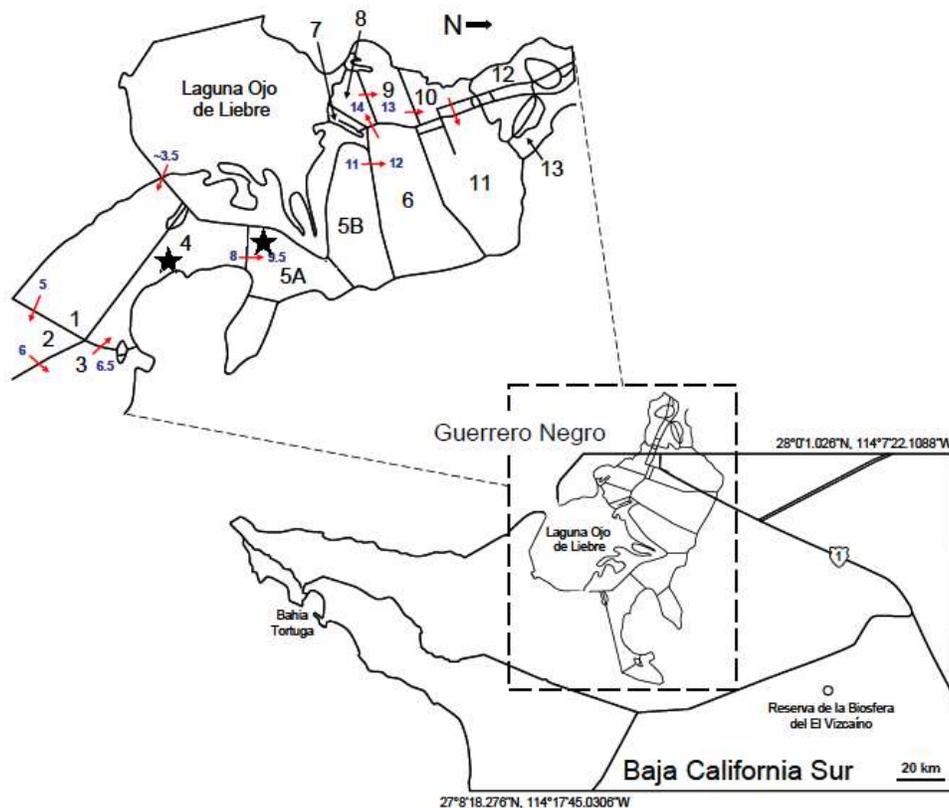
### 5.2 Objetivos particulares

- Comparar la estructura y composición de la comunidad de Bacteria y Arquea entre los dos sitios de muestreo de Exportadora de Sal S.A.
- Evaluar si las diferencias encontradas en el análisis de comunidades microbianas se correlacionan con los análisis fisicoquímicos de las salmueras y tapetes microbianos.
- Detectar la ocurrencia de arqueas metanógenas fuera del orden de los *Methanosarcinales* con capacidad de emplear compuestos metilados con dependencia de hidrógeno en los tapetes microbianos hipersalinos desarrollados bajo los estanques de operación de Exportadora de Sal S.A en Guerrero Negro a través del análisis bioinformático de amplicones del gen que codifica para 16S ARNr.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Descripción del sitio

Exportadora de Sal S.A. (ESSA), la compañía salinera más grande del mundo, con una serie de estanques de evaporación con porcentajes de salinidad creciente que va de 55 ppm a 190 ppm, se sitúa en la costa del Pacífico a  $28^{\circ}$  N de latitud y unos 700 km al sur de la frontera entre México y Estados Unidos. Dentro de algunas de las pozas de concentración de ESSA, se desarrollan tapetes microbianos permanentemente sumergidos que rara vez experimentan alteraciones físicas y que presentan gran estabilidad respecto a su crecimiento/descomposición. Estas condiciones parecen fomentar el crecimiento de poblaciones microbianas anaeróbicas, que contribuyen de manera prominente a la biogeoquímica general de estas comunidades submareales.



**Figura 6.** Mapa de sitio de estudio. Se muestran los estanques concentradores de la empresa Exportadora de Sal, S.A., en Guerrero Negro, Baja California Sur, México. Las estrellas negras representan la ubicación del sitio ESSAA4N1 (estrella izquierda) y ESSAA5N4 (estrella derecha). Las flechas rojas indican la dirección del flujo del agua de mar en evaporación. Cada estanque es identificado mediante un número y las etiquetas azules corresponden al porcentaje de salinidad promedio (Modificado de Lee, 2016)

## 6.2. Muestreo de tapetes microbianos

En junio de 2019, se colectaron muestras por triplicado de tapetes microbianos superficiales (de 5 mm de profundidad por 10 mm de diámetro) del Área 4 cerca de Área 1, ESSAA4N1 (27°36'49,99" N, 113°54'12,63" W) y Área 5 cerca de Área 4, ESSAA5N4 (27°41'20.6 N, 113°55'1.2" W) en Exportadora de Sal S. A. en Guerrero Negro, Baja California Sur, México (Fig. 6).

Variables ambientales como la temperatura, el pH y la salinidad de la salmuera (columna de agua) fueron estimados *in situ* con un termómetro, potenciómetro y refractómetro portátiles. Una vez colectadas, las muestras de sedimento fueron introducidas en recipientes de acrílico y transportadas en condiciones de refrigeración (4 °C) al laboratorio. Ahí, fueron congeladas (-20 °C) en nitrógeno líquido hasta su posterior procesamiento.

La composición química de las muestras de tapete microbiano fue analizada por el Laboratorio de Edafología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), como se detalla a continuación. La concentración de amonio, nitratos y nitritos se realizó siguiendo el protocolo de Strickland y Parsons (1972). La cantidad de fósforo soluble se determinó de acuerdo con el protocolo de Jackson M. L. (1976). La estimación de la conductividad eléctrica, así como de la concentración de calcio y magnesio se realizó siguiendo el procedimiento de Jackson, M. L. (1958). En tanto la concentración de materia orgánica y el potencial de hidrógeno en el sedimento (pH), se estimó de siguiendo el Método de Walkley y Black NOM-021-SEMARNAT-2000 Método AS-07 y 2 NOM-021-SEMARNAT-2000. Método AS-02, respectivamente.

El análisis químico de la salmuera fue realizado por el Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología CIBNOR, como se describe a continuación. La conductividad eléctrica y el potencial hidrógeno (pH) de la salmuera se determinó de acuerdo con el procedimiento interno del laboratorio, con referencia a las normas NMX-AA-093-SCFI-2000 y NMX-AA-008-SCFI-2016, respectivamente. La determinación de amonio disuelto, nitritos y ortofosfatos mediante el método de Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons (1972); la dureza total (calcio y magnesio), alcalinidad (bicarbonatos) y sulfatos se realizó siguiendo los protocolos de "Standard Method for examination de water and wastewater": (<https://www.standardmethods.org/>).

### **6.3. Extracción de ácidos nucleicos y secuenciación de amplicones del gen que codifica para 16S ARNr**

Tres submuestras de cada sitio fueron utilizadas para la extracción de ADN genómico, con el kit DNeasy Power Soil kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. La construcción de las bibliotecas se realizó con el protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation de Illumina, utilizando el conjunto de cebadores 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) que amplifican la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y purificados con perlas magnéticas Ampure XP Beads (Beckman-Coulter). Las muestras fueron etiquetadas con índices del kit Nextera XT (Illumina). El tamaño promedio de cada biblioteca se verificó a través de electroforesis capilar (QIAXEL, Qiagen). Las muestras se normalizaron a una concentración de 4 nM y se realizó la secuenciación en un equipo MiSeq de Illumina con una química de secuenciación V2 de 2x250 ciclos, en CINVESTAV Mérida.

### **6.4. Análisis Bioinformático**

Se obtuvieron lecturas pareadas con una longitud mínima de 250 pb. Los archivos fastq demultiplexados se procesaron con el pipeline Quantitative Insight into Microbial Ecology (QIIME, ver 3.5.3) (Caporaso et al., 2010). La corrección de errores y la eliminación de ruido para resolver las variantes de secuencia de amplicones (ASV) de las lecturas de Illumina se realizaron con el complemento DADA2, eliminando quimeras con el método “consenso” (Callahan et al., 2016, p. 2). Las secuencias representativas de ASV se asignaron taxonómicamente con el complemento clasificador de taxonomía VSEARCH (Rognes et al., 2016) con base en regiones superpuestas y empleando como referencia la base de datos SILVA (v. 138) (Quast et al., 2013).

Las secuencias representativas se alinearon con el algoritmo BLAST y posteriormente se filtraron en busca de gaps y posiciones no conservadas para construir un árbol filogenético con el algoritmo fasttree (Price et al., 2010).

Las tablas de abundancia se exportaron al entorno R, y el análisis estadístico y la visualización se realizaron con las bibliotecas vegan (Oksanen et al., 2013), phyloseq (McMurdie y Holmes, 2015) y ggplot2 (Wickham, 2009).

### 6.4.1. Métricas de diversidad

Dado que el número de secuencias en cada muestra afecta directamente la estimación de la diversidad de especies (menos secuencias = menos capacidad de detección) se realizó una curva de rarefacción buscando determinar si nuestra secuenciación tuvo la suficiente profundidad como para poder detectar a la mayoría de las especies que constituyen ambos sitios.

Los índices de alfa diversidad se calcularon empleando la biblioteca de R phyloseq v3.1 (McMurdie y Holmes 2015) e incluyeron el estimador de cobertura basado en abundancia (ACE), la estimación de riqueza terminal (Chao1), el índice de diversidad de Shannon y el índice de diversidad de Simpson y el proceso de normalización se realizó mediante el método metagenomeSeq v1.32.0 (McMurdie y Holmes 2015).

Para la estimación de la beta diversidad se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con la distancia UniFrac ponderada y no ponderada (Lozupone y Knight, 2006) y un análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) con distancias de disimilitud de Bray-Curtis entre las muestras (Warwick y Clarke, 2001) para evaluar las diferencias entre los sitios, en función de la presencia/ausencia de los taxones microbianos y la distancia filogenética de los mismos.

Así mismo, se calculó la prueba PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) con la función de *adonis* (Anderson, 2001), para evaluar el efecto de las variables ambientales (variables utilizadas como factores independientes) sobre la estructura de las comunidades microbianas. En el análisis de adonis, la matriz de distancias de Bray-Curtis de composición de especies fue la variable de respuesta y el sitio de muestreo la variable independiente. El número de permutaciones se fijó en 719. Todos los demás argumentos utilizaron los valores predeterminados establecidos en la función.

### 6.4.2. Análisis de abundancia diferencial

Las abundancias diferenciales de los ASVs entre ambos sitios se determinaron con un análisis discriminante lineal (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) (Segata et al., 2011) a nivel de Phylum, Orden y Clase utilizando un límite de LDA > 2 y un valor  $p < 0.05$  para las pruebas internas de análisis factorial Kruskal Wallis entre clases y la prueba Wilcoxon por pares, entre subclases.

### 6.4.3. Distribución y análisis filogenético de grupos metanogénicos

Para profundizar en la ocurrencia y distribución de arqueas en los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4, se construyó un mapa de calor con el número de ASVs asignadas a nivel de Orden dentro de este Dominio. Posteriormente, las secuencias representativas de los grupos metanogénicos potenciales encontrados en las áreas de estudio fueron *blasteadas* contra la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) revelando linajes de arqueas con secuencias del gen codificante para la subunidad 16S de ARNr semejantes.

Así mismo y, buscando profundizar en la divergencia evolutiva de los grupos encontrados respecto a otros metanógenos depositados en las bases de datos, se descargaron secuencias nucleotídicas del gen de 16S ARNr, del NCBI, correspondientes a diferentes grupos filogenéticos de arqueas metanógenas. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias a través del software bioinformático Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGAX (Tamura et al., 2021) empleando el algoritmo de construcción progresiva de ClustalW (Thompson et al., 1994), estableciendo UPGMA como árbol guía y respetando el resto de los parámetros predeterminados por el programa.

Finalmente se realizó la estimación de árboles filogenéticos mediante el método de Máxima Verosimilitud a través del software bioinformático MEGAX (Tamura et al., 2021).

## 7. RESULTADOS

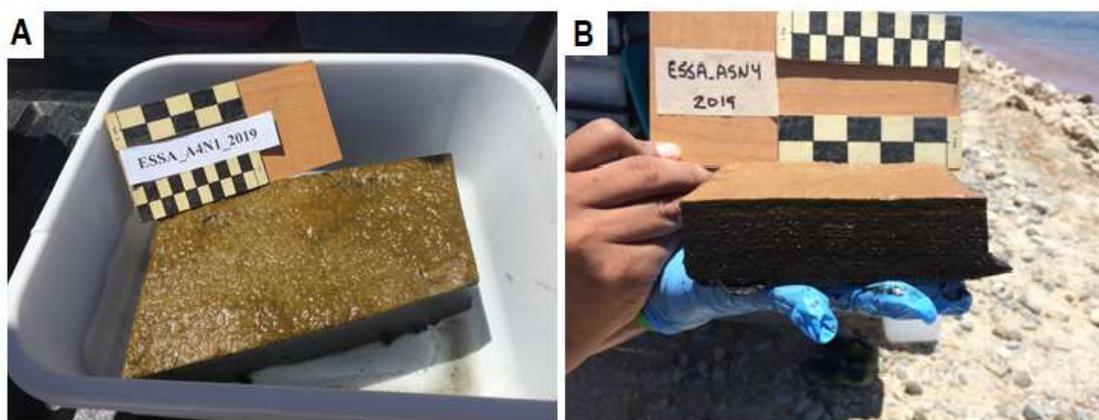
### 7.1. Determinación de las variables fisicoquímicas en muestras de salmuera y tapetes microbianos

La macroestructura y el aspecto general de los tapetes microbianos de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 se muestran en la figura 7. Las propiedades fisicoquímicas y la posición georreferenciada de los sitios estudiados se concentran en la Tabla 3. Los resultados corresponden a la media aritmética de mediciones por triplicado hechos a la columna de agua superficial y al sedimento de los tapetes microbianos.

**Tabla 3.** Determinaciones fisicoquímicas en salmuera y tapetes microbianos en los sitios de muestreo.

Propiedad Fisicoquímica	Sitio	
	ESSAA4N1	ESSAA5N4
Latitud (N)	27.60102	27.69053
Longitud (W)	113.89697	113.92094
Salinidad (ppt) <sup>1</sup>	84	124
Temperatura (°C) <sup>1</sup>	28	24.4
Oxígeno (mg/L) <sup>1</sup>	6.2	7
pH <sup>1</sup>	8.75	8.31
pH <sup>2</sup>	7.29	7.25
Conductividad eléctrica (mS/m) <sup>1</sup>	108.9	130.4
Conductividad eléctrica (dS/m) <sup>2</sup>	77.7	112
Acidez (mg/L CaCO <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>	0.74	12.05
Alcalinidad (mg/L CaCO <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>	211.5	268.4
Amonio (μM) <sup>1</sup>	17.05	1.26
Amonio (mg/Kg) <sup>2</sup>	162.7	208.4
Bicarbonatos (mg/Kg) <sup>2</sup>	43629.4	39052.9
Calcio (mg/Kg) <sup>2</sup>	2404.8	3406.8
Cloruros (mg/L) <sup>1</sup>	30645	52608
Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>	11385	24459
Fosforo Soluble (mg/Kg) <sup>1</sup>	58.6	33.8
Magnesio (mg/Kg) <sup>1</sup>	11791.3	18234
Materia Orgánica (%) <sup>2</sup>	14.1	26.2
Nitritos (μM) <sup>1</sup>	0.438	0.264
Ortofosfatos (μM) <sup>1</sup>	0.2245	0.275
Sulfatos (mg/L) <sup>1</sup>	6323	9539

Notas: Parámetros fisicoquímicos estimados de <sup>1</sup> salmuera (columna de agua); <sup>2</sup> tapete microbiano (sedimento).



**Figura 7.** Tapetes microbianos de A) ESSAA4N1 y B) ESSAA5N4, Guerrero Negro, Baja California Sur.

Acorde a la Tabla 3, variables fisicoquímicas de la salmuera como la salinidad, conductividad eléctrica, dureza, alcalinidad, concentración de sulfatos, ortofosfatos y oxígeno fueron superiores en ESSAA5N4. No así en el caso los nitritos y el amonio cuyos valores son superiores en la columna de agua que cubre los tapetes microbianos de ESSAA4N1. De los parámetros estimados en los tapetes, los valores de materia orgánica fueron superiores en ESSAA5N4, con un valor promedio de 26.2 % contra el 14.1 % registrado en ESSAA4N1. Una disparidad similar se presentó en el caso de la conductividad eléctrica, amonio, magnesio y calcio. De las variables ambientales restantes, el valor estimado de fósforo soluble y bicarbonatos fue superior en ESSAA4N1, en tanto el pH de la salmuera y sedimento varió muy poco entre los dos sitios.

## 7.2 Métricas de Secuenciación

En total se obtuvieron 101 382 lecturas, que se asignaron a 2204 ASVs después del control de calidad, detección, selección y eliminación de quimeras.

**Tabla 4.** Rendimiento de secuenciación del gen del 16S de ARNr luego del multiplexado, *denoising* y control de calidad de amplicones.

Sitio	Muestra	Secuencias				
		Brutas	Filtradas por calidad	%	Limpias	%
ESSAA4N1	GNA4A	16841	15981	94.89	12138	72.07
	GNA4B	16966	16063	94.68	12200	71.91
	GNA4C	16461	15583	94.67	12127	73.67
ESSAA5N4	GNA5A	18164	17117	94.24	12651	69.65
	GNA5B	16939	16066	94.85	10776	63.62
	GNA5C	16011	15143	94.58	10661	66.59

La curva de rarefacción (*Material Anexo, Figura A*) reveló una profundidad adecuada en la secuenciación, ya que luego de aproximadamente cinco mil lecturas, el número de ASVs por cada réplica no aumentó.

### 7.3. Índices de diversidad microbiana en los sitios de muestreo

De los 2 204 ASVs obtenidos luego del del control de calidad, detección, selección y eliminación de quimeras, en la Tabla 5 se presenta el total de las secuencias obtenidas por muestra, el número de ASVs observados, el estimador de Chao y los índices de diversidad de Shannon y Simpson de cada sitio.

**Tabla 5.** Descriptores de alfa diversidad. Secuencias, ASVs observados, estimador de Chao e índices de Shannon-Wiener y Simpson obtenidos a partir de la caracterización de la comunidad microbiana de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4.

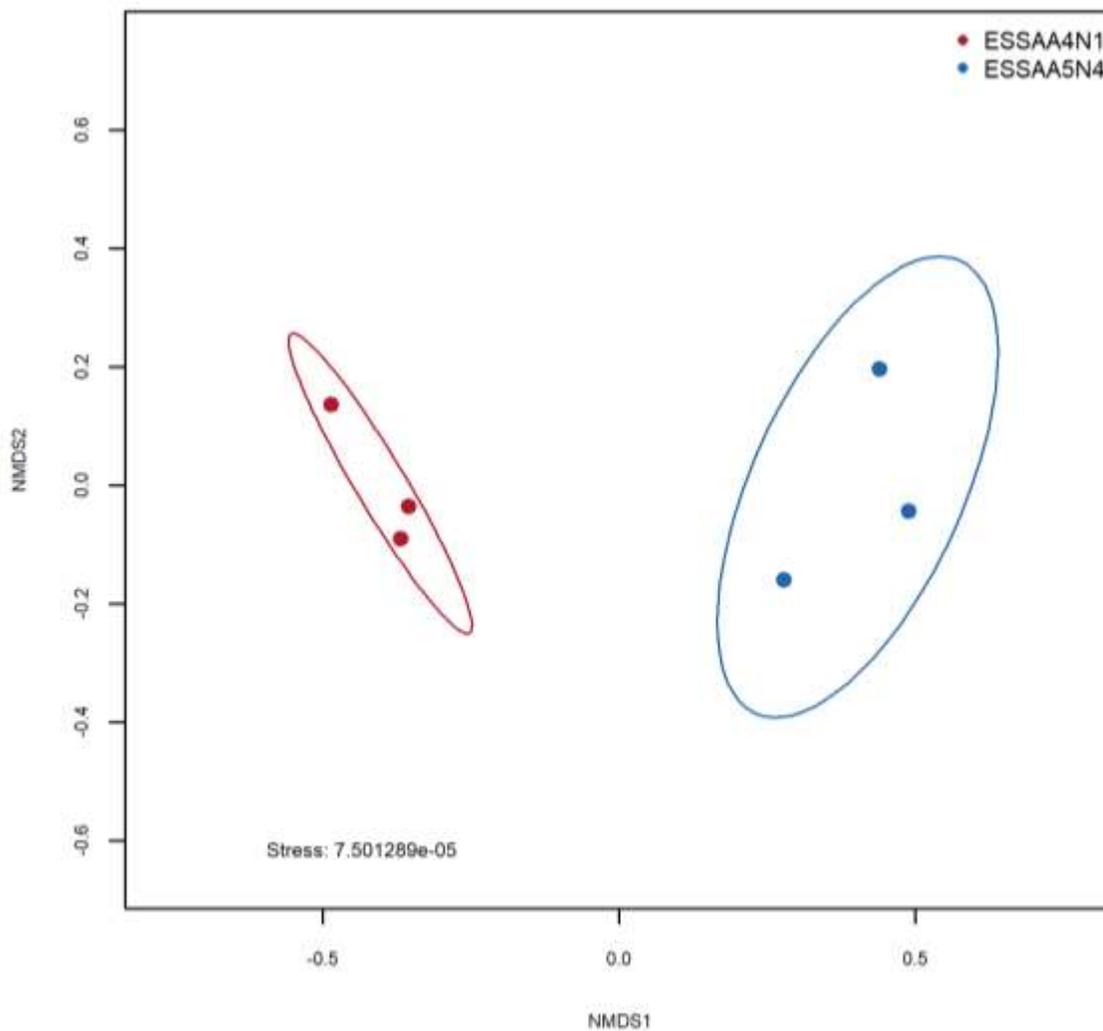
Sitio	Secuencias	ASVs observados	Chao	Shannon	Simpson
ESSAA4N1	12 651	484	533	5.651221891	0.99521536
	12 200	527	582	5.743512667	0.995628715
	12 138	517	547	5.737092506	0.995566172
ESSAA5N4	12 127	549	589	5.575649463	0.992452699
	10 776	395	437	5.055761188	0.987186892
	10 661	425	459	5.166236828	0.987245871

El muestreo cubrió más del noventa por ciento de la totalidad de los grupos de microorganismos presentes en las comunidades microbianas de ambos sitios, ya que el estimador calcula que debería haber un promedio de 554 ASVs para el ESSAA4N1 y 495 ASVs para ESSAA5N4 y se obtuvieron 510 y 456, respectivamente. Aunado a esto, ambos índices (Shannon y Simpson) no presentaron diferencias significativas entre los sitios. La alfa diversidad basada en el índice de Shannon fue mayor en ESSAA4N1 ( $5.71 \pm 0.05$  versus  $5.26 \pm 0.27$ ) con respecto a ESSAA5N4. Sin embargo, la obtención de valores de índice de Simpson cercanos a uno, en ambos sitios, indican gran riqueza de especies en nuestras muestras.

### 7.4. Análisis de la estructura de la comunidad de bacterias y arqueas en los sitios de muestreo

Un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) se llevó a cabo para evaluar si las relaciones taxonómicas y filogenéticas entre las seis muestras poseían una dinámica espacial significativa, a partir de la métrica de similitud de Bray-Curtis, dando como resultado un

agrupamiento de las muestras similar y con mayor proximidad en función al sitio de muestreo (Fig. 8)



**Figura 8.** Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) basado en la métrica de similitud de Bray-Curtis utilizando secuencias del gen que codifica para la subunidad 16S ARNr obtenidos de los sitios ESSAA4N1 (color rojo) y ESSAA5N4 (color azul) por triplicado. Una mayor distancia entre puntos indica que su diversidad de filotipos es más diferente o menos similar. Los valores de estrés  $<0,2$  significan una representación confiable de los datos en una gráfica de dos dimensiones.

El gráfico NMDS se presenta con un valor de tensión de  $7.501289e-05$  en la ordenación bidimensional, el cual indica el grado de desajuste entre los valores predichos de la regresión de la matriz de similitud y las distancias entre muestras mostradas por el gráfico. De acuerdo con la bibliografía, los valores de estrés inferiores a 0.20 generalmente indican una ordenación adecuadamente interpretable (Clarke, 1993).

Posteriormente, se realizó el análisis de similitud (ANOSIM) para probar la hipótesis nula de que no hay diferencias entre los conjuntos de comunidades del ESSAA4N1 y ESSAA5N4, a partir de la matriz de similitud de Bray-Curtis (719 permutaciones). Este procedimiento no paramétrico, compara los rangos de distancias entre grupos con rangos de distancias dentro de los grupos. Se comparan las medias de esos dos tipos de rangos y la estadística de prueba R resultante mide que tan distintos ( $R=1$ ) o semejantes ( $R=0$ ) son en estructura. Los niveles de significancia, incluido el valor p y R (un indicador de separación entre grupos; los valores más altos indican mayores diferencias en los conjuntos de comunidades), se determinaron mediante permutaciones aleatorias de cada matriz de Bray-Curtis. Los resultados mostraron diferencias ( $R = 0.8519$ ;  $P < 0.1$ ) entre los dos conjuntos de comunidades microbianas, corroborando así que la estructura de la comunidad variaba significativamente según el sitio de muestreo

### 7.5. Relación de los parámetros ambientales sobre la estructura de las comunidades microbianas

Una vez observada una distribución diferenciada de taxones microbianos respecto al sitio de muestreo (Fig. 8), el análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) sugirió que de las variables ambientales estimadas (Tabla 3), sólo la concentración de oxígeno y materia orgánica, el pH, salinidad y conductividad eléctrica de la salmuera tuvieron impacto estadístico destacado sobre la disimilitud entre las comunidades.

**Tabla 6.** Prueba PERMANOVA realizada en la matriz de distancia UniFrac, basada en datos de secuenciación masiva del gen 16S ARNr y su relación con las variables ambientales medidas en este estudio.

Variable	F	R <sup>2</sup>	Pr (>F)	P
Oxígeno	3.0048	0.38006	0.1	.
Materia orgánica	2.994	0.41044	0.06667	*
pH	2.2579	0.04567	0.002778	**
Salinidad	2.9901	0.08454	0.03889	*
Conductividad Eléctrica	3.016	0.07929	0.01389	*

**Nota:** Valores de significancia (<0.001 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '' 1)

De acuerdo con la Tabla 6, la concentración de oxígeno y de materia orgánica explicaría el 38 y 41% de la variación en la composición de especies entre ESSAA4N1 y ESSAA5N4, respectivamente; la salinidad el 8.45%, la conductividad eléctrica el 7.9% y el pH el 4.5% (véase

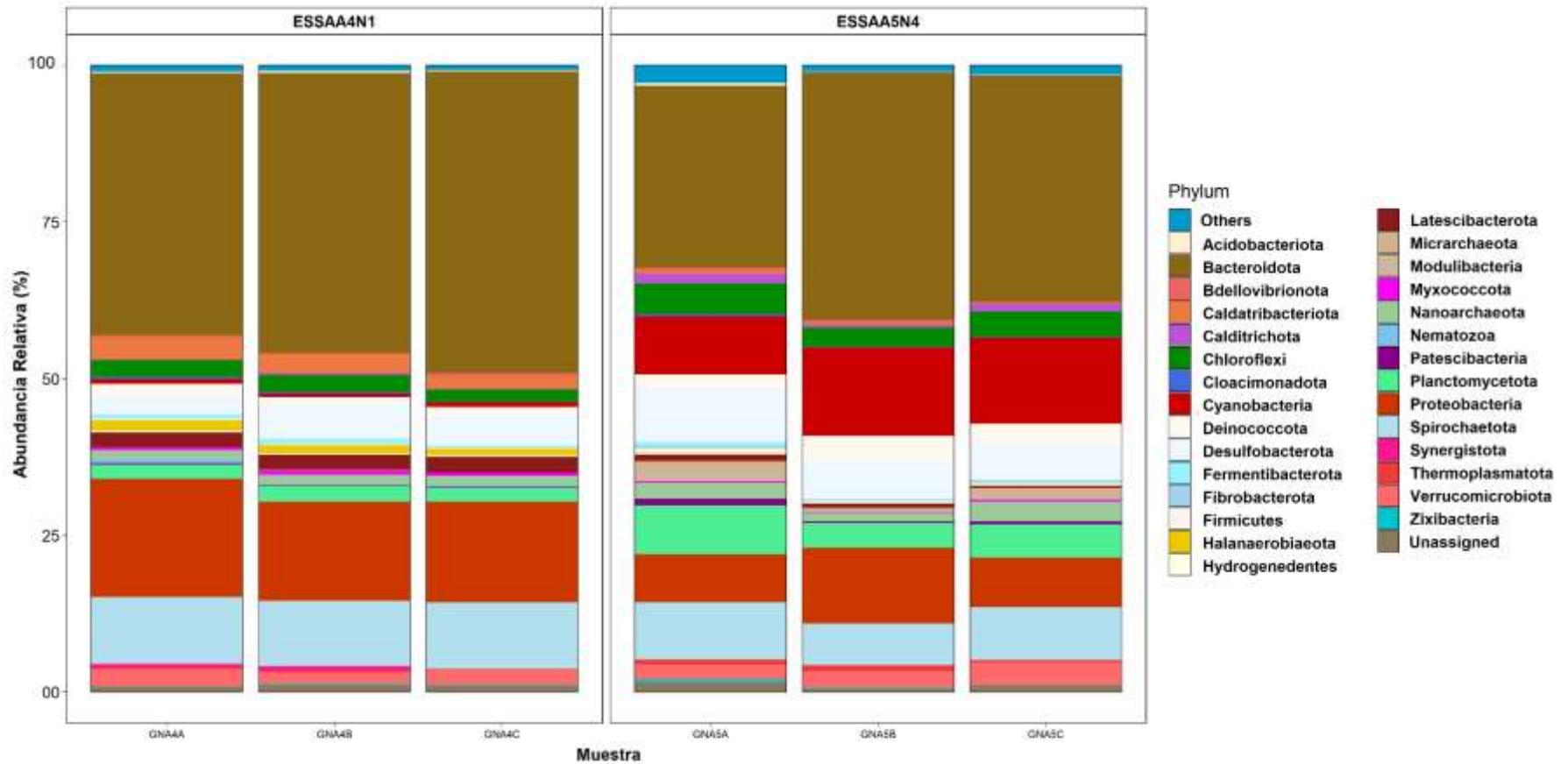
R<sup>2</sup>). En conjunto, los resultados de ambos análisis —NMDS y PERMANOVA—, afirman que la estructura de la comunidad microbiana entre ambos sitios es distinta.

### 7.6. Composición de las Comunidades de Bacteria y Arquea

Del total de ASVs asignadas, a nivel taxonómico de Dominio, once permanecieron sin identificar, 2020 fueron asociadas al dominio Bacteria, 190 al Dominio Arquea y sólo 7 al Dominio Eukarya. El conjunto de datos final incluyó 70 556 secuencias y 2204 ASVs de las cuales 40 permanecieron sin clasificar a nivel de *Phylum*.

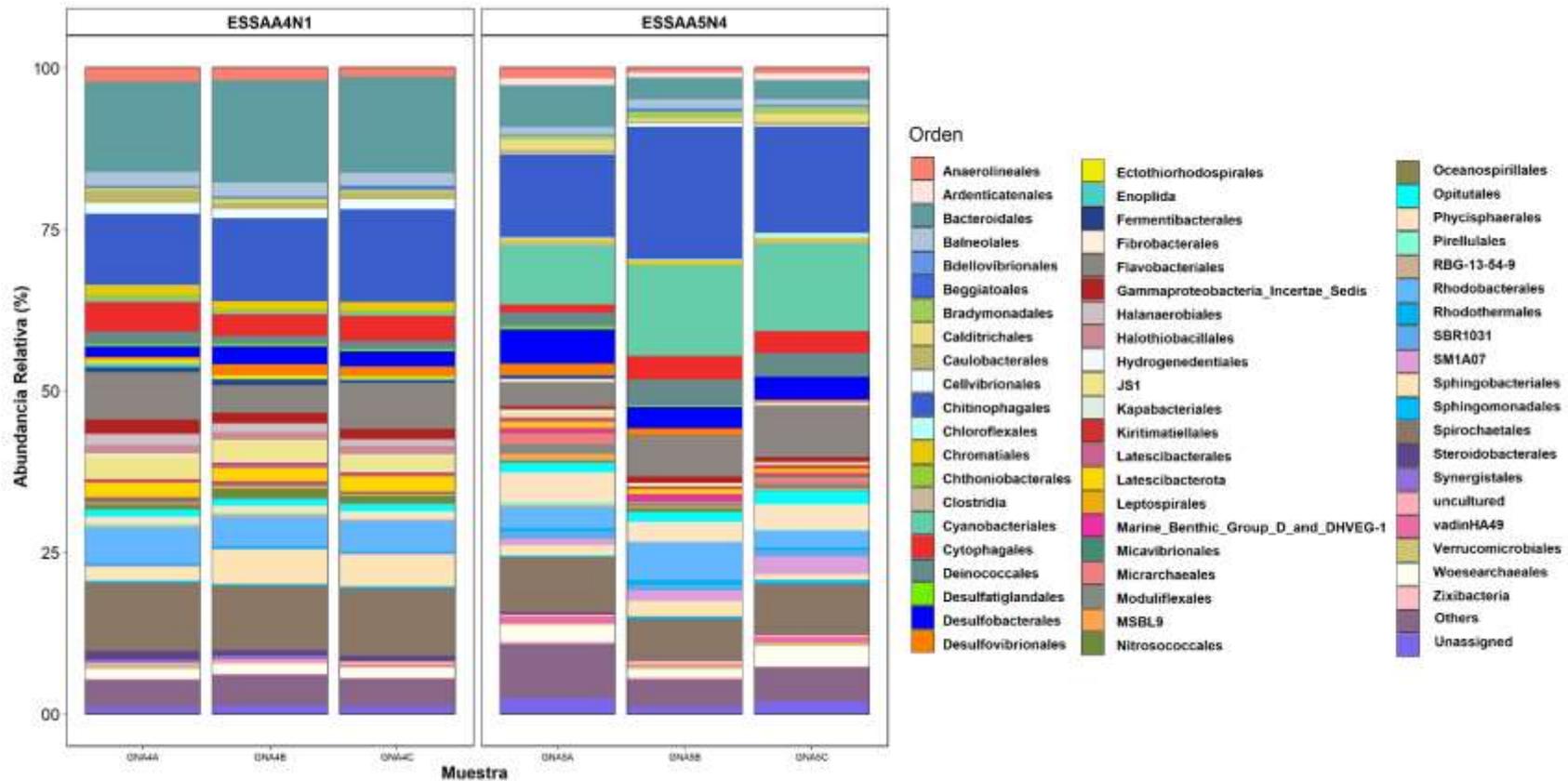
Se observó una mayor abundancia relativa de Bacteria con respecto a miembros de Arquea. Bacteria representó > 96% de las secuencias del gen que codifica para 16S de ARNr en ambos sitios, mientras que Arquea poco más del 3% y menos del 1% fueron asignadas al dominio Eukarya.

La composición de la comunidad de Bacteria en las muestras correspondientes a ESSAA4N1 estuvo compuesta por 38 Phyla, pero solo 19 linajes de ellos estuvieron representados en una abundancia superior al 1% de la comunidad total de ese sitio (Fig. 9). Los Phylum *Bacteroidota*, *Proteobacteria* y *Spirochaetota* fueron los taxones de mayor abundancia, seguidos por *Caldatribacteriota*, *Desulfobacterota*, *Verrucomicrobiota*, *Chloroflexi*, *Latescibacterota* y *Planctomycetota*. Por otra parte, en ESSAA5N4, la comunidad bacteriana estuvo constituida por 40 Phyla de los cuales sólo 14 presentaron valores de abundancia relativa superiores al 1% (*Material Anexo; Tabla A*). En ellos, al igual que en ESSAA4N1, *Bacteroidota* fue el phylum con mayor abundancia relativa con valores que van desde 29.6 a 39.7 % en las muestras; seguido de miembros de *Cyanobacteria* con valores de 9.5 a 14.2%, *Spirochaetota* (6.64-9.32%) y *Desulfobacterota* (5.6-8.75%), *Proteobacteria*, *Chloroflexi* y *Verrucomicrobiota*.



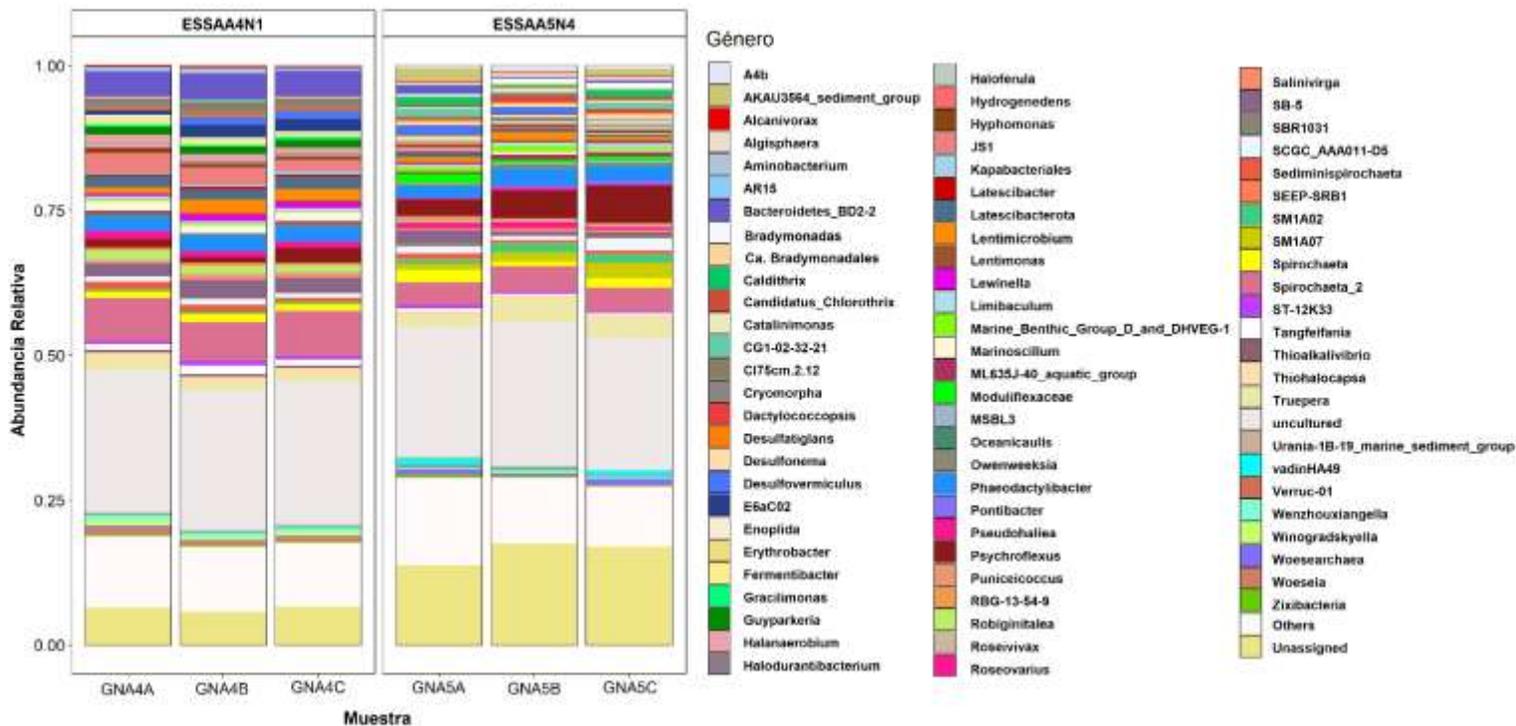
**Figura 9.** Abundancia relativa a nivel de Phylum de Bacteria y Arquea de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Exportadora de Sal S.A. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada Phylum. Los ASVs cuya abundancia relativa fue <1% se representan en color azul en la parte superior de las barras.

A nivel taxonómico de Orden (Fig. 10), la diversidad identificada en las comunidades bacterianas de ESSAA4N1 se compone principalmente por *Bacteroidales* (~15.14%), *Chitinophagales* (~12.95%) y *Spirochaetales* (~10.52%). En tanto ESSAA5N4 se distingue por la abundancia de *Chitinophagales* (13.15 – 20.8%), *Cyanobacteriales* (~ 12.54%) y *Flavobacteriales* (~ 6%), seguido por miembros de *Bacteroidales*, *Deinococcales* y *Desulfovibrionales*.



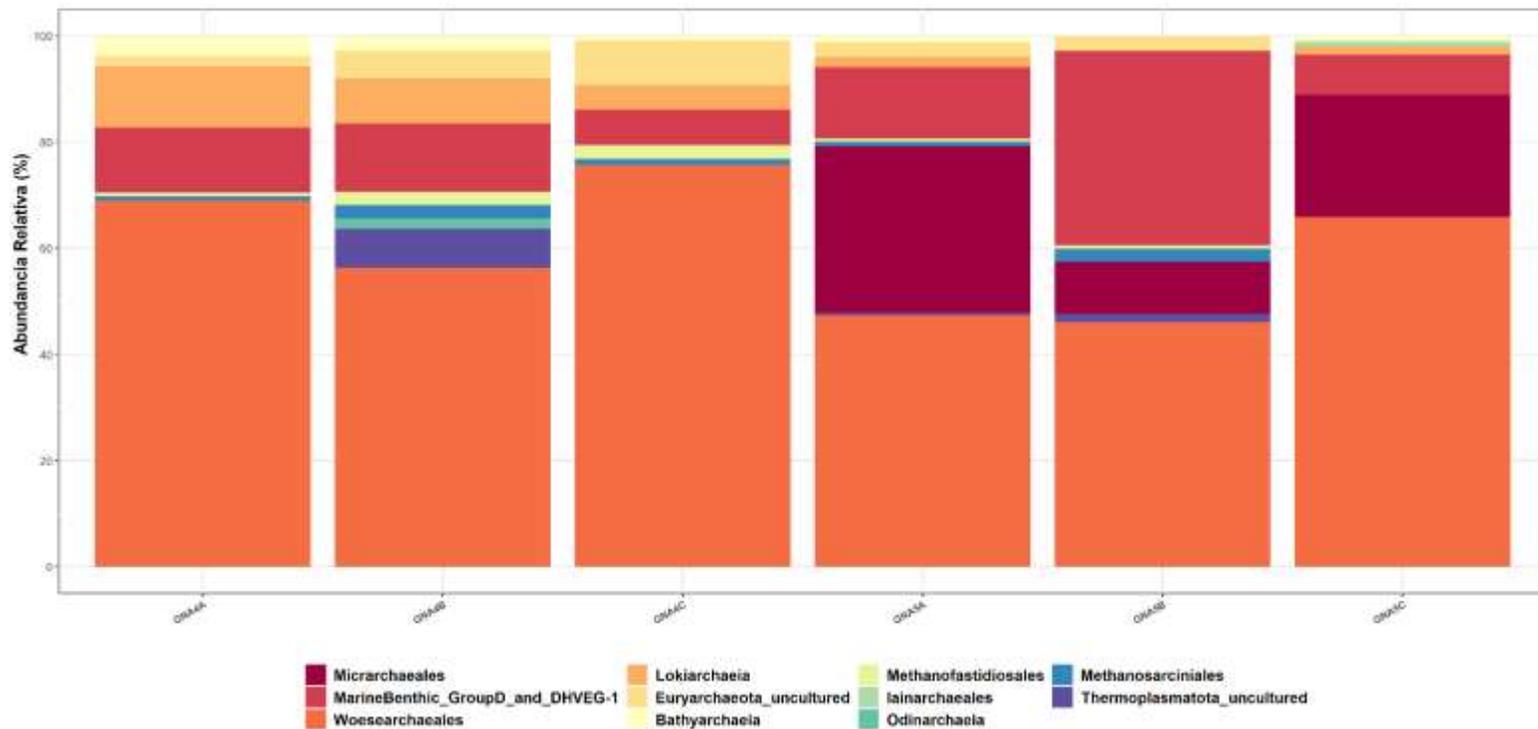
**Figura 10.** Abundancia relativa a nivel de Orden de Bacteria y Arquea de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Exportadora de Sal S.A. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada Orden. Los ASVs cuya abundancia relativa fue <1% se representan en color violeta bajo la leyenda de “Others”.

A nivel de género (Fig. 11), tanto en ESSAA4N1 como ESSAA5N4, dominaron secuencias asignadas a microorganismos no cultivados con aproximadamente el 30% y el 36% de las abundancias, seguido de miembros del género *Spirochaeta* con abundancias cercanas al 8% en ambos sitios. La comunidad de ESSAA4N1 estuvo compuesta, además, por miembros del género *Bacteroidetes* (~ 5%), *JS1* (2-4%), *Phaeodactylibacter* y *SB-5* con aproximadamente el 3%. La de ESSAA5N4, por otra parte, estuvo integrada por miembros de *Psychroflexus* (~6%), *Truepera* (~4%) y el grupo *AKAU3564*. A nivel de género, de los miembros de cianobacteria, sólo *Dactylococcopsis* fue detectado en el sitio ESSAA5N4.



**Figura 11.** Abundancia relativa a nivel de Género de Bacteria y Arquea de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Exportadora de Sal S.A. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada género. Los ASVs cuya abundancia relativa fue <1% se representan en color azul marino bajo la leyenda de "Others".

Se reconocieron 8 Phyla del dominio Arquea (*Tabla A; Material Anexo*), tanto en ESSAA4N1 como en ESSAA5N4, los grupos mejor representados (~3% de la comunidad total), fueron *Nanoarchaeota*, *Thermoplasmatota*, *Asgardarchaeota* y *Crenarchaeota*, con un intervalo de abundancias relativas de 55.1 a 73.26%, 12 a 17.4%, 2 a 9.8% y de 0.5 a 2.6% respectivamente. Además, se detectaron linajes de *Euryarchaeota* en muy baja abundancia relativa (<1%) pertenecientes al Orden de *Methanosarcinales* y *Methanofastidiosales*, así como miembros pertenecientes al *Grupo Bentónico Marino D* y *DHVEG-1*.



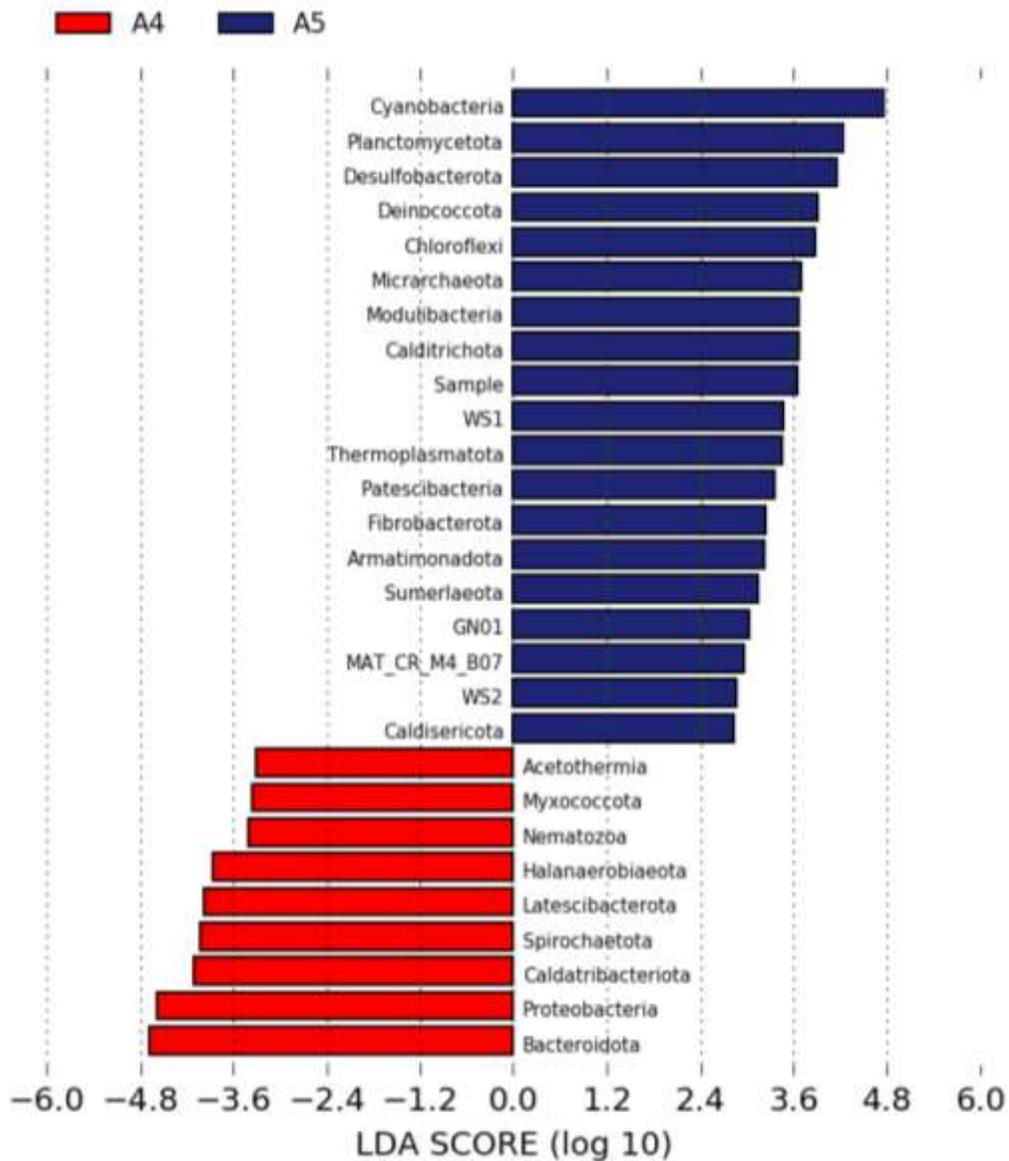
**Figura 12.** Composición de la comunidad del dominio Arquea correspondientes a las muestras de ESSAA4N1 y ESSAA5N4 de Exportadora de Sal S.A de C.V a nivel de *Orden*. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada *Orden*. Las suscritas como “*Thermoplasmatota\_uncultured*” y “*Euryarchaeota\_uncultured*” no alcanzaron una asignación taxonómica a nivel de orden, por lo que se especifica su Phylum.

La mayoría de las lecturas correspondientes al Dominio Arquea obtenidas a nivel de Orden (Fig. 12) estuvieron asociadas a *Woesearchaeales* en ambos sitios. Este linaje propio del superphylum DPANN, representó entre el 56.3 y 75.6 % en ESSAA4N1 mientras que en ESSAA5N4 su abundancia relativa respecto al dominio osciló entre 46.02 y 65.8%. El *Grupo Bentónico Marino D* y *DHVEG-1* fue el segundo grupo mejor representado con aproximadamente 10.6% de la abundancia en ESSAA4N1 y 19.2 % en ESSAA5N4. *Micrarchaeales* y *Iainarchaeales* sólo fueron identificados en ESSAA5N4, constituyendo el 21.35 % y <1% de las lecturas, respectivamente, caso contrario al de *Odinarchaeia* cuya ocurrencia se registró únicamente en uno de los triplicados de ESSAA4N1. Grupos con potencial metanogénico tales como *Methanofastidiosales*, *Methanosarcinales*, así como miembros de *Bathyarchaeia* y *Thermoplasmata* no cultivados fueron identificados en ambos sitios, con abundancias que van del 1.5 al 2.4% en ESSAA4N1 y del 0.42 al 1.1% en ESSAA5N4 del total de la comunidad de arqueas en el tapete (*Tabla B; Material Anexo*).

Nematodos (género *Enoplida*), artrópodos (género *Acari*) dinoflagelados (género *Biecheleria*) e invertebrados (género *Kalyptorhynchia*) también fueron identificados en las muestras de tapete, constituyendo en conjunto, aproximadamente 1% de la comunidad biológica total.

### **7.7. Análisis de abundancia diferencial de las comunidades microbianas**

El análisis discriminante lineal por efecto de tamaño (LEfSe) a nivel de Phylum (Fig. 13) reveló una clara distinción entre las comunidades microbianas de ambos sitios. Veinticinco phyla bacterianos, dos del dominio Arquea y uno de Eukarya mostraron valores de LDA superiores a 2, que corresponde al umbral en la puntuación LDA logarítmica para características discriminatorias. Los taxones diferencialmente abundantes detectados en ESSAA4N1 corresponden a *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Caldatibacteriota*, *Spirochaetota*, *Latescibacterota*, *Halanaerobiaeota*, *Nematozoa*, *Myxococcota* y *Acetothermia*. Mientras que en ESSAA5N4 destacó *Cyanobacteria*, *Planctonmycetota*, *Desulfobacterota*, *Deinococcota* y *Chloroflexi* entre los phyla bacterianas diferencialmente abundantes, así como *Micrarchaeota* y *Thermoplasmata* por parte de las arqueas.



**Figura 13.** Análisis discriminante lineal (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel de Phylum que resultaron diferencialmente abundantes entre las muestras de tapete microbiano de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 de la empresa Exportadora de Sal S.A, en Guerrero Negro B.C.S.

### 7.8 Detección de arqueas metanógenas ajenas al Orden de los *Methanosarcinales*

Se exploró a nivel taxonómico de Orden y mediante un mapa de calor, los miembros del Dominio Arquea detectados con la secuenciación, la mayoría de los cuales presentaron abundancias relativas inferiores al 1% de la comunidad microbiana total (definida por la proporción de lecturas de amplicones 16S ARNr). La figura 14 describe la ocurrencia y distribución de órdenes de Arquea para cada una de las réplicas de tapete microbiano. Se

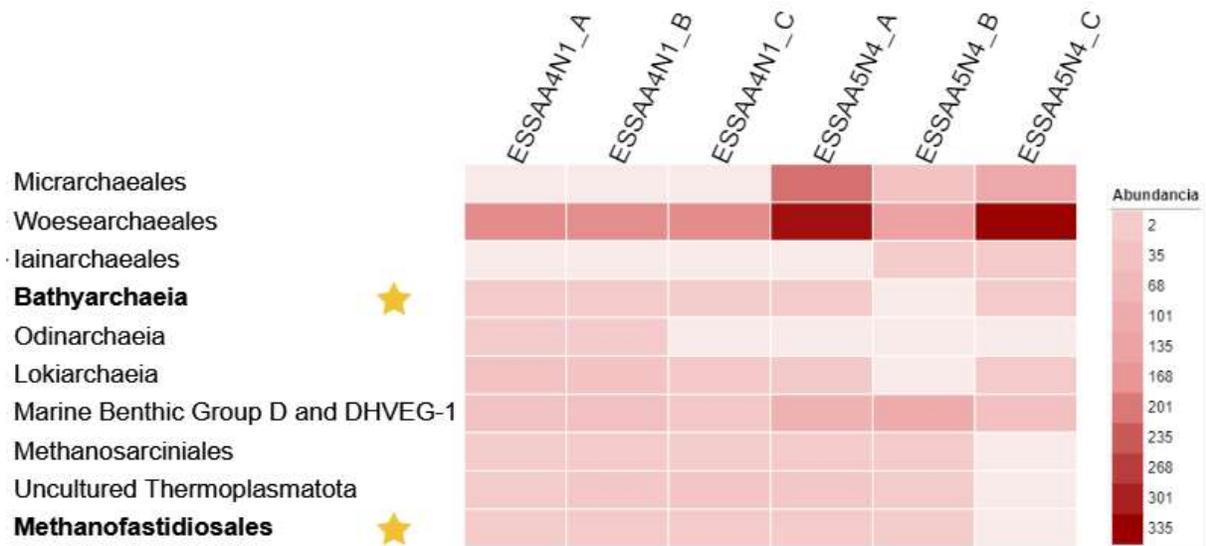
muestran notables diferencias en la composición a nivel de *Orden* de los dos sitios. Mientras que ESSAA1N4 mostró mayor reproducibilidad en las tres replicas en comparación con ESSAA5N4, ESSAA5N4 mostró grupos de arqueas con valores de mayor abundancia relativa en comparación con ESSAA1N4. *Wosearchaeales* presentaron los valores mayores de abundancia relativa en dos de las tres replicas. *Micraarchaeales* que se detectó en todas la réplicas de ESSAA5N4 con abundancias que van desde 9.68 a 31.35% y *Iainarchaeales*, orden detectado en sólo una de las réplicas. Por su parte, el orden *Odinarchaeia* fue detectado exclusivamente en una de las réplicas de ESSAA4N1, con una abundancia apenas superior al 1%.

Cuatro secuencias del gen codificante para la subunidad 16S del ARNr obtenidas de la secuenciación se presentan en árbol filogenético (Fig. 15). De estas, la secuencia “ESSA GN2019 Methanosarciales”, fue filogenéticamente cercana a *Methanohalophilus halophilus* (NZ\_CP017921). La secuencia “ESSA GN2019 Thermoplasmota uncultured” resultó cercana a una secuencia (KF309696) detectada en ESSA-A9 en 2014. La secuencia ESSA GN2019 Methanofastidiosales fue cercana a una secuencia de arquea no cultivable (AF47914.1) aislada de una salinera costera en España y lejanamente asociada a la secuencia de *Methanothermobacter sp.* (NZ\_CP044013.1), miembro del orden hidrogenotrófico *Methanobacteriales*. En tanto la secuencia “ESSA GN2019 Bathyarchaeia” fue cercanamente relacionada con Crenarchaeote no cultivable (AB712069).

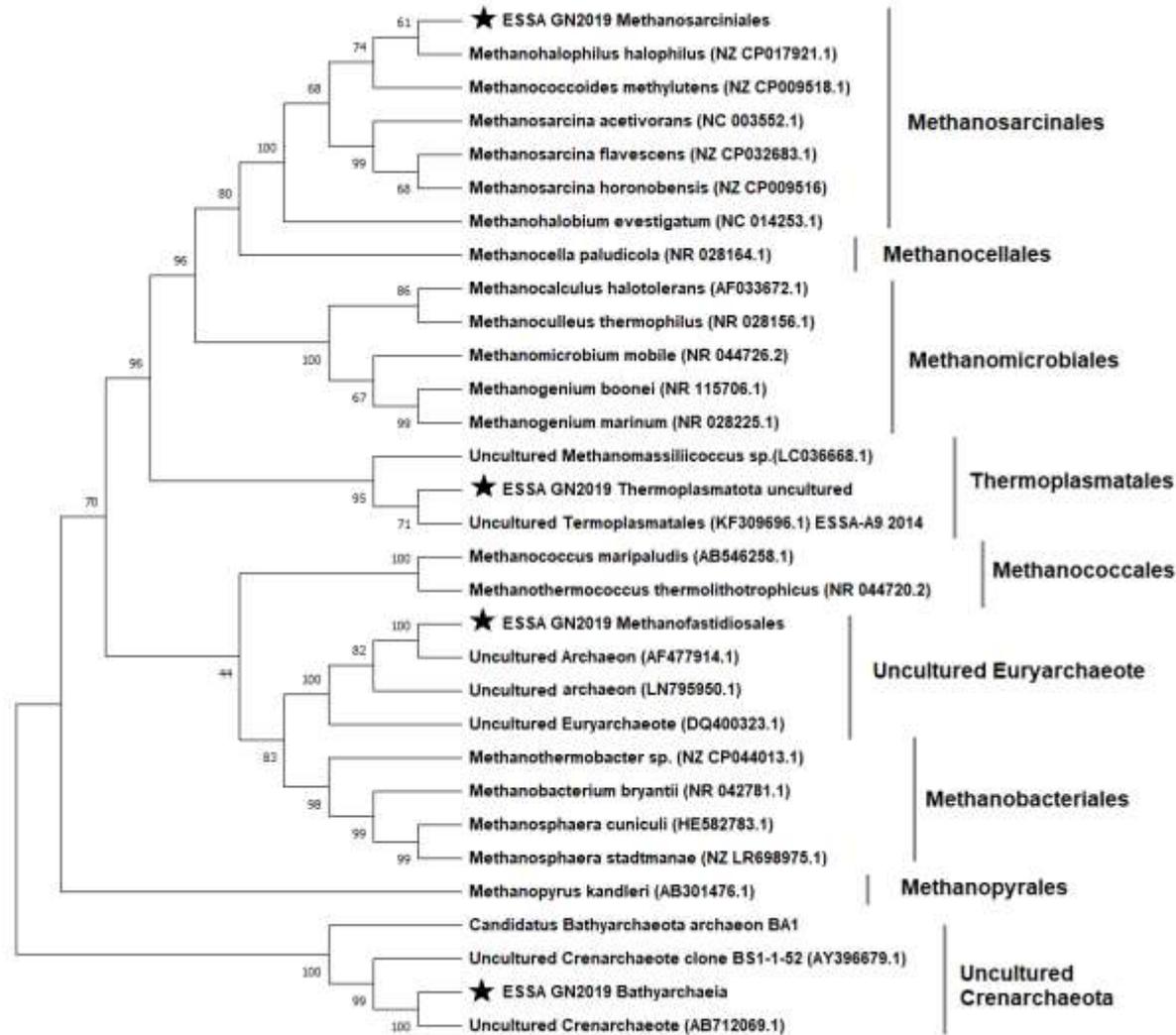
Fue notable que aquellas anotadas como *Bathyarchaeia* y *Methanofastidiosales* aparecen ambas, lejanamente relacionadas con el clado de *Methanosarcinales*, Orden de metanógenas metilotróficas que, destacándose por ser los más halotolerantes (Oren 1999), se pensaba, era el único grupo metanogénico en condiciones de hipersalinidad.

De acuerdo con su colocación en el árbol filogenético, las secuencias asociadas a *Bathyarchaeia* parecen estar única y estrechamente relacionadas con miembros del *Crenarchaeota no cultivables*, mientras *Methanofastidiosales* presenta relación cercana con secuencias de *Euryarchaeota* no cultivables y lejanamente relacionados con miembros del orden *Methanobacteriales*.

Dado que un principio el orden *Methanomassiliicoccales*, primer clase de metanógenos metilotróficos dependiente de hidrógeno descrita, fue incluida dentro del phylum *Ca. Thermoplasmatota*, las secuencias correspondientes a miembros no cultivados de este grupo también fueron consideradas a fin de profundizar en su colocación taxonómica y divergencia evolutiva con respecto a metanógenos descritos y depositados recientemente en las bases de datos.



**Figura 14.** Abundancia de los grupos de arqueas a nivel de Orden detectados en las muestras de tapetes microbianos de ESSAA4N1 y ESSAA5N4, la mayoría de ellas con valores <0,1% de la comunidad total. En el eje superior de la X se indican las muestras ordenadas jerárquicamente por área, el Orden se representa en el eje Y y su correspondiente abundancia se indica en la cuadrícula del mapa de calor.



**Figura 15.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud, basado en la comparación de grupos metanogénicos potenciales detectados en tapetes microbianos hipersalinos de ESSA. (círculos rojos rellenos) con secuencias del gen de la subunidad 16S rRNA de arqueas metanogénicas. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei.

## **8. DISCUSIÓN**

La amplificación y secuenciación directa del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr a través de la plataforma Illumina, permitió profundizar en la composición y estructura de las comunidades microbianas que constituyen los tapetes hipersalinos de Guerrero Negro, B.C.S. El haber profundizado en la diversidad, estructura y composición de estas comunidades permite tener una mayor comprensión de la riqueza y complejidad que caracteriza este tipo de ecosistemas y respalda la aceptación de la hipótesis.

Dado que existe escasa información acerca de la ocurrencia de arqueas metanogénicas con un metabolismo metilotrófico dependiente de hidrógenos en ambientes hipersalinos, y particularmente en Guerrero Negro, no hay antecedentes publicados sobre el tema, la detección de grupos potenciales con este metabolismo es una indudable contribución al conocimiento que se tiene sobre estos linajes de arqueas.

En la presente sección se busca contrastar los resultados obtenidos con los patrones de diversidad reportados previamente en este tipo de sistemas, buscando detectar potenciales interacciones entre sus poblaciones microbianas e incrementar la comprensión sobre la estructura y dinámica de diversidad en los tapetes hipersalinos de las áreas de estudio.

### **8.1. Diversidad Microbiana**

Pese a que los estudios de diversidad microbiana están bien documentados en tapetes hipersalinos de Guerrero Negro (Cadena et al., 2018; García-Maldonado et al., 2018, 2014; Harris et al., 2013; Kelley et al., 2015; Ley et al., 2006), el principal desafío en el estudio de comunidades microbianas corresponde a los sesgos inherentes a las metodologías, los cuales, incluso empleando la misma métrica, no permiten una comparación directa entre las comunidades (Shade, 2017).

Para un conjunto de datos obtenidos por secuenciación de alto rendimiento, como es el caso, tanto la asignación taxonómica como los enfoques de agrupamiento tienen limitaciones críticas. Los análisis que clasifican las lecturas de secuencia por similitud con las entradas de la base de datos taxonómicos pueden proporcionar descripciones de diversidad mal resueltas,

especialmente para muestras recolectadas de entornos de alta diversidad (Eren et al., 2013). En este sentido, la descripción de comunidades microbianas a partir de ASVs permite una perspectiva diferente de su composición, pudiendo analizar secuencias con la máxima resolución permisible, y sin riesgo de introducir desviaciones debido a la referencia taxonómica (Callahan et al., 2016). Sin embargo, uno de los costes de este método conlleva una posible pérdida de secuencias reales que estarían presentes en muy bajas abundancias (Almela et al., 2021).

El análisis de amplicones reveló una gran proporción de ASVs con abundancias relativas entre 0.01 y 0.1 % del total de la comunidad microbiana, asumiendo un papel clave en la heterogeneidad de las comunidades microbianas que componen los tapetes de ESSAA4N1 y ESSAA5N4. No obstante, los umbrales de agrupamiento superiores al 97% de identidad pueden llevar a una sobreestimación de la biosfera rara presente en las muestras (Kunin et al., 2010).

Estudios previos (Harris et al., 2013; Ley et al., 2006) han postulado que la complejidad de la comunidad de los tapetes microbianos está relacionada con la distribución espacial de microorganismos y la diferenciación de nichos correlacionados con gradientes fisicoquímicos profundos dentro del mismo. En este sentido, el estimador Chao suele ser un indicador de riqueza adecuado puesto que considera la proporción de ASVs previamente observadas (recapturadas) en relación con aquellas que han sido detectadas sólo una vez y agrega un factor de corrección al número de ASVs observado (Chao, 1984; Chao et al., 1993). Considerando que existe una correlación de  $R^2 = 0.97$  entre el número de ASVs y dicho estimador (Chao, 1984), el esfuerzo de secuenciación fue suficiente para para realizar una caracterización adecuada de la comunidad microbiana al cubrir más del noventa por ciento de la totalidad de grupos de microorganismos estimados en las comunidades microbianas de ambos sitios.

Las diferencias en riqueza entre el número de ASVs observados y el índice de Chao pudiera deberse a que, aun con el factor de corrección, Chao puede quedarse corto al examinar una gran cantidad de organismos poco abundantes (la biosfera rara), que como se mencionó anteriormente, constituye gran parte de los taxones identificados en nuestras comunidades microbianas.

Luego de que el índice de Chao estimara que en general, existe una mayor riqueza de individuos en los tapetes microbianos de ESSAA4N1, los índices de Shannon y Simpson mostraron valores elevados para ambos sitios. De acuerdo con Magurran (2004), tanto el índice de Shannon como el de Simpson incrementan en función de la riqueza y equitatividad de las muestras. Con un índice de Shannon de  $5.71 \pm 0.05$  en ESSAA4N1 *versus*  $5.26 \pm 0.27$  en ESSAA5N4 y valores muy cercanos a uno para índice de Simpson, el número de especies y de individuos por cada especie es muy similar en ambos sitios, de modo que no se aprecia una diferencia significativa entre los grupos.

## 8.2 Estructura y Composición de las Comunidades Microbianas

Para evaluar si las relaciones taxonómicas y filogenéticas entre las réplicas de ESSAA4N1 y ESSAA5N4 poseían una dinámica espacial significativa, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de una matriz de distancia UniFrac ponderada y no ponderada (*Fig. B Material Suplementario*), así como un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS; *Fig. 8*) a partir de la métrica de similitud de Bray-Curtis, dando como resultado un agrupamiento de las réplicas en función al sitio de muestreo.

Tomando en consideración únicamente la relación filogenética, el gráfico de UniFrac no ponderado (*Fig. B.1, Material Anexo*) mostró que las secuencias obtenidas de ESSAA4N1 correspondían a organismos estrechamente relacionados. Mientras que el gráfico de UniFrac ponderado (*Fig. B.2, Material Anexo*) sirvió para confirmar la elevada similitud de las réplicas tanto en diversidad como en abundancia relativa. No así para ESSAA4N5, donde la distribución de las réplicas sugiere una menor proximidad filogenética entre las secuencias y distinta abundancia relativa de los microorganismos entre una réplica y otra; sugiriendo que sería necesario un mayor número de muestreos para lograr describir adecuadamente la estructura de la comunidad microbiana de este sitio.

Dichos resultados se vieron reforzados con el Escalamiento Multidimensional No Métrico basado en la métrica de similitud de Bray-Curtis (*Fig. 8*), cuya ordenación, además de implicar una mayor similitud de diversidad microbiana y abundancias entre las réplicas ESSAA4N1 respecto a las de ESSAA5N4, señala que la estructura de las comunidades entre un sitio y otro es muy diferente.

De acuerdo con nuestros resultados, el phylum *Bacteroidota* fue el grupo mejor representado en ambos sitios, con valores que van desde 42 a 49% en ESSAA4N1 y de 29.6 hasta 39.7% en ESSAA5N4. Entre los grupos detectados que pertenecen a este phylum se incluyen aerobios facultativos (*Chitinophagales*), anaerobios estrictos (*Bacteroidales*), quimiorganótrofos (*Cytophagales*, *Flavobacteriales*) y microorganismos no fotosintéticos (*Balneolales*, *Sphingobacteriales*) los cuales ha sido documentado, se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos (Demergasso et al., 2004; Fernandez et al., 2016; Wang et al., 2012) y sistemas hipersalinos, incluidos los tapetes microbianos (Ley et al., 2006; Rasuk et al., 2016; Sørensen et al., 2005) y evaporitas (Stivaletta et al., 2011). Activos en múltiples capas del tapete microbiano, los miembros de *Bacteroidetes* son muy importantes para el ciclo del Carbono (Harris et al., 2013) ya que se especializan en la descomposición de materia orgánica disuelta de alto peso molecular (O'Sullivan et al., 2006).

*Proteobacteria* fue el segundo *Phylum* mejor representado en ESSAA4N1, con una abundancia relativa promedio de 18% de miembros de la Clase *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, entre los que se incluyen microorganismos aerobios de metabolismo quimiorganotrofo (*Cellvibrionales*), quimiolitautotrófo (*Steroidobacterales*, *Halothiobacillales*, *Nitrosococcales*), heterótrofo (*Oceanospirillales*, *Caulobacterales*), fotótrofo anaeróbico anoxigénico (*Rhodobacterales*, *Chromatiales*) y bacterias oxidantes de azufre haloalcalifílicas (*Ectothiorhodospirales*). Las proteobacterias son importantes para el ciclo del azufre puesto que comprenden bacterias purpuras del azufre (el clado gamma: por ejemplo, *Chromatiales*, detectados con mayores abundancias en ESSAA4N1) y bacterias sulfato reductoras: *Desulfobacterales* y *Desulfovibrionales*. Las *alfa-proteobacterias* que comprenden las bacterias púrpuras no sulfurosas del Orden *Rhodobacterales* están presentes en ambos sitios. Particularmente, miembros de la familia *Rhodobacteraceae* fueron detectados con mayores abundancias en ESSAA4N1. Estos últimos son organismos fotoheterótrofos versátiles que pueden adoptar diferentes estrategias tróficas y por tanto ocupar varios nichos en los tapetes (Garrity et al., 2001).

Las secuencias del gen 16S rRNA asignadas al *Phylum Spirochaetota* también fueron abundantes en las réplicas correspondientes a ESSAA4N1 (Fig. 9), estando asociadas principalmente a las familias *Spirochaetaceae* y *Leptospiraceae*. Seguido por la Clase JS1 del *phylum*

*Caldatribacteriota*, cuya dominancia en ambientes anóxicos que contienen hidrato de metano ha sido previamente documentada (Inagaki et al., 2003; Lee et al., 2018). *Desulfobacterota*, *Verrucomicrobiota*, *Chloroflexi*, *Latescibacterota* y *Planctomycetota* son otros de los *phyla* mejor representados en ESSAA4N1.

Un dato interesante de este sitio fue el hallazgo de una muy baja proporción de secuencias de cianobacterias con respecto a ESSAA5N4 (dónde este Phylum representó aproximadamente el 12% de la comunidad microbiana). No obstante, el análisis por microscopia de contraste de fases y fluorescencia de muestras de ESSAA5N4-2019 (DATOS NO PRESENTADOS), mostraron una macroestructura caracterizada por una capa amarilla-naranja de 0.5 mm en el tope y por debajo una capa verde de 0.3 mm. de las capas amarillo-naranja se reconocieron e identificaron, diatomeas, cianobacterias unicelulares *Halotheca/Dactylococcopsis*, filamentosas *Oscillatoria*, bacterias quimiolitótopas *Beggiatoa*. Mientras que en la capa verde cianobacterias filamentosas como *Microcoleus*, *Oscillatoria*, unicelulares como *Chroococcus*, bacterias púrpuras fototróficas anoxigénicas y bacterias quimiolitótopas *Beggiatoa* (A. López Cortés, comunicación personal).

La detección única de la cianobacteria *Dactylococcopsis* por secuenciación del 16S ARNr a nivel de Género podría estar relacionada al espectro de cobertura y/o resolución por parte de los cebadores (Klindworth et al., 2013). Sin embargo, la elección del conjunto 515F/806R dirigidos a la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr tuvo como precedente, además del amplio rango de cobertura, la longitud de amplicón y la destacada representatividad de grupos tanto de Bacteria como de Arquea que no eran detectados con los sugeridos para la secuenciación a través de Illumina MiSeq.

En conjunto con los sesgos asociados a las metodologías (técnica de homogenizado y extracción de DNA, así como el conjunto de primers utilizado), la detección del género *Salinivirga* perteneciente al Orden *Bacteroiales* en el sitio ESSAA4N1, pudiese explicar la baja abundancia de cianobacterias debido a que este género se ha caracterizado por su capacidad anaeróbica de degradar la biomasa de cianobacterias en tapetes microbianos hipersalinos (Ben Hania et al., 2017).

*Spirochaetota* fue también el tercer phylum mejor representado de ESSAA5N4 (6.64-9.32%) con miembros del género *Spirochaeta*, *Sediminispirochaeta*, *Alkalispirochaeta* y *Leptospiraceae*,

grupos bacterianos que han sido reportados en las capas ricas en sulfuro de hidrógeno de tapetes microbianos costeros (Berlanga et al., 2008; Fracek y Stolz, 1985; Ley et al., 2006), seguido por miembros del phylum *Desulfobacterota* (5.6-8.75%) compuesto principalmente por bacterias sulfato reductoras, el metabólicamente diverso *Proteobacteria*, *Chloroflexi* y *Verrucomicrobiota*. Este último, que incluye varios representantes con capacidad de oxidar metano del suelo, se identificó por primera ocasión en todas las muestras de tapete de ESSAA5N4 con una representación de 1 a 2%.

Contrario a los resultados del presente trabajo, el grupo bacteriano *Chloroflexi*, representado en ESSAA4N1 con abundancias apenas superiores al 2% y en ESSAA5N4 con abundancias de hasta 4.95%, se había reportado previamente como uno de los principales constituyentes en los tapetes microbianos de Guerrero Negro (Ley et al., 2006). Las bajas abundancias reportadas en este trabajo podrían deberse a que la presencia de este grupo microbiano está asociada a las capas anóxicas más bajas de los tapetes (Lee et al., 2014; Ley et al., 2006; Wong et al., 2015), con profundidades que superan los 6mm. Este grupo, además de *Acidobacteria* (abundancias <1% en ambos sitios) y *Actinobacteria* (detectado únicamente en ESSAA4N5) se ha reportado que cumplen un papel importante en el ciclo del carbono y el azufre (Bolhuis et al., 2014).

Con aproximadamente el 2% del acervo genético total de 16S ARNr en las muestras de tapete microbiano, *Woesearchaeota*, caracterizado por su tamaño nanométrico, fue el taxón dominante en lo que respecta a la comunidad de arqueas. Este Orden fue detectado por primera vez en respiraderos hidrotermales de aguas profundas (Takai y Horikoshi, 1999), pero desde entonces se ha demostrado que está muy extendido en ambientes acuáticos con pH que va desde 4.4 hasta 10.1 según lo informado por Ortiz-Alvarez y Casamayor (2016). Estudios recientes informan que su distribución está determinada especialmente por la salinidad y la anoxia, ya que la mayoría de estas arqueas anaeróbicas obligadas o facultativas viven en hábitats anóxicos, salinos o hipersalinos (Liu et al., 2018; Megyes et al., 2021).

El Grupo Bentónico Marino D (MBG-D) del phylum *Thermoplasmatota* estuvo también bien representado en las muestras de tapete de ambos sitios. Consiste en un grupo de secuencias estrechamente relacionadas, aisladas de sedimentos marinos subsuperficiales. Aunque se trata de un grupo no cultivado y muy poco estudiado, es uno de los linajes de arqueas sedimentarias

más frecuentes con distribución generalizada y alta abundancia (Zhang et al., 2020). Análisis de coocurrencia indican una asociación significativa no aleatoria de MBG-D con arqueas anaeróbicas metanotróficas en filtraciones impulsadas por metano (Inagaki et al., 2006) y con miembros de *Lokiarchaeota* (tanto en sedimentos salinos como de agua dulce) sugiriendo interacciones potenciales entre estos grupos de arqueas. Además, su ocurrencia parece ser independiente de las zonas biogeoquímicas de sulfato reducción y metanogénesis (Holmkvist et al., 2011; Lloyd et al., 2013) en sedimentos marinos que contienen hidratos de CO<sub>2</sub> y en ambientes hipersalinos (Swan et al., 2010).

Representantes de *Micrarchaeota* e *Iainarchaeota*, ambos pertenecientes al recién reconocido superphylum DPANN, fueron detectados únicamente en las réplicas correspondientes a ESSAA5N4. Se sabe que los miembros de *Micrarchaeota* poseen un metabolismo heterótrofo versátil y se encuentran en entornos hostiles como el drenaje ácido de las minas aunque también fueron encontrados en una variedad de entornos no ácidos, incluyendo tapetes hipersalinos, turbas, lagos de agua dulce y de agua subterránea (Chen et al., 2018), lo que indica su potencial capacidad de adaptación. Asimismo, los análisis de la distribución ecológica global de *Iainarchaeota* sugieren su preferencia por los ambientes no oligotróficos (por ejemplo, tapetes microbianos, bosques de alta productividad, plantas de tratamiento de aguas residuales (Vishnivetskaya et al., 2013) y suelos (Portillo et al., 2013).

Como representantes del *Superphylum* Asgard, miembros de *Lokiarchaeota* fueron detectados, aunque en bajas abundancias, en ambos sitios, mientras que secuencias asociadas con *Odinarchaeota*, únicamente en ESSAA4N1. La ocurrencia de ambos linajes ha sido ampliamente documentada en entornos anaeróbicos y el análisis de su genoma los coloca como microorganismos potencialmente mixotróficos con capacidades metabólicas divergentes, entre las que se encuentran fijar CO<sub>2</sub> mediante la vía tetrahidrometanopterina Wood-Ljungdahl, realizar acetogénesis y participar activamente en la degradación de la materia orgánica (Cai et al., 2021, 2018).

Como único representante del *Superphylum* TACK, secuencias de *Bathyarchaeota*, fueron identificadas en ESSAA4N1 y, con menor abundancia en ESSAA5N4. Pese a la distribución ubicua de este linaje en el ambiente terrestre, algunos subgrupos muestran una alta especificidad y una

buena adaptación a ciertos hábitats. Por ejemplo, se ha demostrado que la salinidad determina significativamente la composición y abundancia de *Bathyarchaeota* tanto en sedimentos marinos como en lagos de agua dulce (Fillol et al., 2016; Xiang et al., 2017) y conduce a la diversificación del phylum dentro de un hábitat específico (Auguet et al., 2010). Los análisis genómicos de este grupo sugieren su capacidad para producir metano a partir de compuestos metilados (Evans et al., 2015), fijar dióxido de carbono través de acetogénesis (He et al., 2016) y reducir de forma disimilatoria nitrito a amonio (Lazar et al., 2016).

Detectados en ambos sitios, pero en muy bajas abundancias, los miembros del orden *Methanosarcinales* tienen la gama de sustratos más amplia entre los metanógenos. Todos los miembros pueden producir metano desproporcionando compuestos que contienen grupos metilo (metanol, metilaminas, metiletanolaminas, betaína o sulfuros de metilo) o dividiendo el acetato (Lyu y Liu, 2019b). La mayoría de las especies, hasta ahora descritas fueron aisladas de ambientes marinos y requieren una salinidad cercana a la del agua de mar para un crecimiento óptimo (Garrity et al., 2001).

La comparación entre sitios sugiere una clara participación de taxones anaeróbicos en los tapetes microbianos de ESSAA4N1 mientras que el sitio ESSAA5N4 indica principalmente géneros fotosintéticos y heterotróficos. Entre las Clases diferencialmente abundantes de los tapetes microbianos del sitio ESSAA5N4 en comparación con los del sitio ESSAA4N1 (*Fig. C, Material Anexo*), se observan representantes de cianobacterias, bacterias involucradas en el ciclo biogeoquímico del azufre: *Desulfomonadia*, bacterias sulfato reductoras *Desulfobacteria* y linajes con metabolismo sacarolítico estrictamente fermentativo como *Phycisphaerae*. Sintrófos anaerobios de la Clase *Anaerolineae* fue otro de los linajes diferencialmente abundantes de ESSAA5N4, por mencionar algunos. La Clase bacteriana características termófilas y quimiolitotóxicas *Acetothermia*, así como *Myxococcia*, *Rhodothermia*, *Bacteroidia*, *Spirochaetia*, *Halanabacteriia* y *Latescibacterota* fueron identificados entre los grupos diferencialmente abundantes de ESSAA4N1 con respecto a ESSAA5N4, así como secuencias asociadas a nematodos de la Clase *Enoplea* y arqueas pertenecientes a la Clase *Thermoplasmata* y *Micrarchaeia*.

### 8.3 Correlación entre los análisis fisicoquímicos y las diferencias encontradas en el análisis de comunidades microbianas

Para entender y describir la fisiología de los microorganismos dentro de su nicho ambiental y sus posibles relaciones sintróficas con otros organismos, gran parte de los desafíos actuales radican en lograr interpretar los patrones de diversidad observados en función de los parámetros ambientales contextuales. Buscando profundizar en la influencia de factores ambientales, ya sea a nivel bioquímico o energético sobre la composición y estructura de las comunidades de ESSAA4N1 y ESSAA5N4, se llevó a cabo una prueba de análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA). Dicho análisis indicó que los parámetros ambientales que mejor permiten explicar las diferencias estructurales entre una comunidad y otra son: el contenido de materia orgánica ( $R^2=0.41$ ), la concentración de Oxígeno ( $R^2=0.38$ ), la salinidad ( $R^2=0.084$ ), la conductividad eléctrica ( $R^2=0.079$ ) y la temperatura ( $R^2=0.045$ ). Esto, concuerda con lo descrito por Franks y Stolz (2009), quienes señalan que la presencia y abundancia de especies procariotas en un tapete microbiano está fuertemente influenciada por propiedades físicas como luz o temperatura y parámetros químicos clave como el oxígeno, el pH, el potencial redox y la salinidad, así como la disponibilidad de aceptores y donantes de electrones.

El contenido de materia orgánica y concentración de oxígeno como principales factores ambientales que explican la diferencia estructural de las comunidades pudieran estar relacionados con la abundancia relativa de cianobacterias en las mismas, ya que el metabolismo fotosintético autótrofo oxigénico de este tipo de microorganismos explica la variación de dichos parámetros ambientales de ESSAA5N4 respecto a ESSAA4N1 y subraya el papel de las comunidades microbianas bentónicas como los productores primarios más importantes en este sitio.

Aunque con frecuencia, las cianobacterias son los principales autótrofos reportados en tapetes microbianos (Visscher y Stolz, 2005; Visscher y van Gemerden, 1993), dada la presencia limitada de ASVs correspondientes a cianobacterias en las réplicas de ESSAA4N1, es plausible que miembros de *Acetothermia*, Clase que resultó diferencialmente abundante (Fig. 13), contribuyan a la fijación de dióxido de carbono en la comunidad microbiana de este sitio; conjuntamente con miembros de *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, grupos

abundantes en dichas muestras y que de acuerdo con van Gernerden (1993), contribuyen significativamente a la producción primaria de tapetes microbianos y microbialitas.

Como tercer factor ambiental que resultó estadísticamente significativo, estudios previos ya han revelado efectos de la salinidad sobre la estructura de la comunidad microbiana de tapetes que fueron expuestos a diferentes salinidades (Bebout et al., 2002; Smith et al., 2008). Asimismo, se sabe que la salinidad juega un papel crucial en el ciclo del carbono dentro de los tapetes microbianos al afectar la diversidad y actividad de los microorganismos en el involucrados (Abed et al., 2010; García-Maldonado et al., 2014).

Cationes como el  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ , a menudo son un reflejo de la conductividad eléctrica dado que tienden a acumularse en suelos salinos y, entre más salino sea el suelo, mayor conductividad eléctrica presentará (Helling et al., 1964). Aunado a esto, se ha documentado que entre mayor cantidad de materia orgánica esté presente mayor será la capacidad de los sedimentos de retener estos cationes (Helling et al., 1964; Kamprath y Welch, 1962). Por tanto, tiene sentido que estas características (bases intercambiables, salinidad, conductividad eléctrica y materia orgánica) presentasen el mismo patrón en los resultados, valores más altos en las muestras correspondientes a ESSAA5N4 con respecto a los obtenidos en ESSAA4N1.

Finalmente, en conjunto con la actividad de agua, se ha documentado que el pH tiene un efecto significativo sobre los microorganismos y los consorcios microbianos a nivel nano y microescala ya que influye en el gradiente quimiosmótico y generador de energía a nivel celular (Andrei et al., 2012; Lane y Martin, 2012). Si bien el pH citoplasmático de los microorganismos alcalifílicos debe ser de 7.2 a 8.7 para desempeñar adecuadamente las funciones celulares para la supervivencia y el metabolismo (Krulwich et al., 2011), ahora se sabe que, además del pH intracelular, los microorganismos son capaces de excretar metabolitos orgánicos, resultado de reacciones metabólicas, cambiando así el pH ambiental inmediato (Zhang et al., 2016). Esto sugiere que el pH puede controlarse metabólicamente a nivel intracelular y local, a diferencia de otros parámetros ambientales como la radiación, la temperatura o la presión y explicaría la aparente, poca variación de este parámetro entre las réplicas de ESSAA4N1 y ESSAA4N5.

#### 8.4 Reconstrucción de los procesos sintróficos del tapete microbiano a partir de los grupos detectados

Aunque la técnica de secuenciación de amplicones 16S de ARNr es un aspecto clave de los estudios de comunidades microbianas, no proporciona evidencia directa de las capacidades funcionales de una comunidad (Oyewusi et al., 2021). Sin embargo, fue a partir de la detección de grupos microbianos y su capacidad de degradación de diferentes sustratos produciendo metano como producto final, que se logró especular acerca del proceso de sintrofia en los tapetes microbianos de Guerrero Negro.

En los estanques de la operación de ESSA abundan microinvertebrados como crustáceos (*Artemia*, *Fabrea* y *Trichocorixa*) e insectos (*Ephydra*), ricos en quitina, algas verde, ricas en celulosa y restos de macroalgas ricas en agar y alginatos (Javor, 1989; López-Cortés, 1990). Estos polímeros se caracterizan por ser recalcitrantes y solo algunos grupos de microorganismos son capaces de hidrolizarlos. En este sentido, la detección de secuencias del 16S de ARNr correspondientes al orden *Chitinophagales* (grupo quimioheterótrofo muy bien representado en ambos sitios), con frecuencia son asociadas a la degradación de polisacáridos como la quitina y la celulosa (Berg et al., 2009). Así mismo, los géneros *Puniceicoccus* y *Haloferula*, ambos pertenecientes al Phylum *Verrucomicrobiota* (con abundancias ~ 3% en ambos sitios) y los miembros del Orden *Fibrobacterales*, se destacan por participar en la degradación de celulosa (Abdul Rahman et al., 2016). Miembros del Phylum *Planctomycetota* y de género *Algisphaera*, con capacidad de degradar agar, también fueron detectados, aunque con mayores abundancias en ESSAA5N4.

Monómeros resultantes, producto de la degradación de estos polímeros y otras moléculas orgánicas como proteínas y lípidos sirven de sustrato para otros grupos bacterianos detectados. Por ejemplo, los monosacáridos producto de la hidrólisis, pudiesen ser usados por los Géneros: *Truepera*, *Verruc-01*, *Zixibacteria*, *Spirochaeta*, *Sediminispirochaeta*. Mientras que compuestos orgánicos como los aminoácidos serían degradados por bacterias fermentativas del Orden *Fermentibacterales* y *Anaerolineales*, detectados en ambos sitios, *Ardenticanatenales*, *Calditrichales*, *Cytophagales*, *Truperia*, *Flavobacterales*, observados con mayores abundancias en ESSAA5N4 y *Zixibacteria*, *Spirochaetales* y *Kapabacterales*, mejor representados en

ESSAA4N1, hasta ácidos grasos volátiles (AGV), lactato, formiato, alcoholes (como etanol), hidrogeno y dióxido de carbono (Visser et al., 1993).

Posteriormente, productos como el propionato y el butirato serían oxidados por bacterias acetogénicas, como las pertenecientes al orden *Desulfobacterales*, las cuales estuvieron mejor representadas en ESSAA5N4, *Deinococcales* detectado en ambos sitios, así como *Halanaerobiales* y *Synergistales*, ordenes representados únicamente en ESSAA4N1 a acetato e hidrogeno.

Dado que en sistemas hipersalinos la oxidación de propionato y butirato a acetato es realizada mediante asociaciones sintróficas entre bacterias acetogénicas y bacterias sulfato reductoras hidrogenotróficas (Widdel 1988), la reducción de sulfato es el proceso respiratorio microbiano anaerobio dominante en estos ecosistemas (King, 1988b; King et al., 1983; Muyzer y Stams, 2008; Nobu et al., 2015). Sin embargo, la metanogénesis, que constituye el paso final en la degradación anaerobia de la biomasa y que generalmente tiene lugar, luego de que otros aceptores de electrones como el oxígeno, nitrato y sulfato, han sido reducidos (Schink y Stams, 2013) también se encuentra bien documentada en estos entornos (García-Maldonado et al., 2014, 2012; Orphan et al., 2008).

Generalmente, la ocurrencia de grupos metanógenos con metabolismo metilotrófico en este entorno se asocia a la presencia de compuestos que contienen grupos metilo, los cuales, además de ser considerados sustratos no competitivos, corresponden a osmolitos comunes de organismos marinos. Por ejemplo, la forma oxidada (N-óxido) de trimetilamina, es un osmolito común de peces pelágicos como el atún y la sardina. Esta forma oxidada puede ser reducida a trimetilamina (TMA) por la actividad microbiana de *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Alteromonas* (grupos detectados principalmente en ESSAA4N1) y arqueas halófilas extremas como *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax* (Barrett y Kwan, 1985; Oren, 2013; Welsh, 2000). La TMA también puede ser sintetizada por bacterias sulfato reductoras del Orden *Desulfobacterales* y *Desulfovibrionales* (grupos detectados en ambos sitios), a partir de la colina (constituyente de las membranas celulares de eucariontes ampliamente distribuida), la cual puede ser transformada en glicina-betaina (osmo regulador) y ésta a su vez en TMA por fermentación

hecha por *Acetohalobium*, *Clostridium* y *Haloanaerobacter* (los últimos dos, detectados en ESSAA4N1 y ESSAA5N4).

En relación con lo anterior, los grupos metanógenos mejor representados suelen ser los metilotróficos del Orden *Methanosarcinales*. Sin embargo, este no fue el único grupo metanogénico detectado en los tapetes hipersalinos de ESSAA4N1 y ESSAA5N4. Miembros del recién reconocido Orden *Methanofastidiosales* fueron detectados, aunque en menores abundancias, en ambos sitios. De acuerdo con su anotación genómica, este grupo carece de la vía metabólica Wood-Ljungdahl, así como de genes que codifican citocromos y síntesis de metanofenazina (Nobu et al., 2016), sugiriendo que realizan metanogénesis metilotrófica independiente de citocromos como todos los metanógenos distintos de *Methanosarcinales* (Thauer et al., 2008) empleando hidrógeno como agente reductor.

Aunado a esto, datos de anotación metagenómica revelaron la especialización de este grupo en el uso de tioles metilados como sustrato metanogénico (Nobu et al., 2016), a través de la cual los *Methanofastidiosales* no solo pueden establecer un puente entre los ciclos de carbono y azufre en ambientes eutróficos como estos, sino que también pueden competir potencialmente los microorganismos reductores de sulfato, contribuyendo, además a regular la presión parcial de H<sub>2</sub> en el tapete.

Secuencias asociadas al recién propuesto phylum *Bathyarchaeota* también fueron identificadas en los tapetes microbianos hipersalinos de ESSAA4N1 y ESSAA5N4. La secuenciación del genoma, casi completo de este grupo de microorganismos pertenecientes al Superphylum TACK, reveló el hallazgo de genes homólogos divergentes necesarios para el metabolismo del metano, incluidos los que codifican el complejo de metil-coenzima M reductasa (MCR) (Evans et al. 2015), apuntando a una vía metanogénica potencial basada en el uso de compuestos metilados, como la que se encuentra en los metanógenos metilotróficos dependientes de H<sub>2</sub> del orden *Methanomassiliicoccales* (Gagen et al., 2013; Kubo et al., 2012). Asimismo, y dado que requieren carbono orgánico exógeno (acetato o propionato) como fuente de carbono para su crecimiento, este grupo de microorganismos ya había sido previamente detectado en ambientes eutróficos, como los lodos de tratamiento. aguas residuales, digestores y manglares (Wilkins et al., 2015; Zhang et al., 2020).

## 8.5 Análisis filogenético de arqueas metanógenas fuera del Orden *Methanosarcinales* en los tapetes microbianos de Guerrero Negro

Luton et al. (2002) reveló que la filogenia de los metanógenos establecidos a partir del gen que codifica la subunidad de 16S ARNr es congruente con árboles filogenéticos basados en secuencias de aminoácidos inferidos a partir del gen *mcrA*, clave en el estudio de comunidades metanogénicas, el análisis filogenético (Fig. 15) se realizó con las secuencias de los grupos metanogénicos encontrados en las áreas de estudio, buscando profundizar en su divergencia evolutiva con respecto a microorganismos metanógenos depositados en las bases de datos.

Estudios previos han sugerido metanógenos moderadamente halófilos del género *Methanohalophilus* como metanógenos metilotróficos dominantes en ambientes hipersalinos (García-Maldonado et al. 2012, 2014). Una vez más, nuestro estudio corrobora su ocurrencia ya que , con base en análisis BLAST y cladogramas filogenéticos, las secuencias de 16S ARNr de *Methanosarcinales* se encuentran estrechamente relacionadas con estos microorganismos.

Respecto a los otros grupos de metanógenos que fueron detectados en los tapetes microbianos de ESSAA4N1 y ESSAA5N4, estudios previos de la localidad habían reportado ya el hallazgo de arqueas metanógenas hidrogenotróficas putativas en condiciones de incubación a bajas concentraciones de sulfatos (García-Maldonado et al., 2014; Smith et al., 2008). En ese entonces, el análisis filogenético de dichas secuencias fue desconcertante dado que se asociaban con arqueas del Orden *Methanomicrobiales*, el cuál posee un metabolismo metanogénico estrictamente hidrogenotrófico.

Cómo único miembro de *Methanomicrobiales* con la característica de ser halotolerante, secuencias del gen 16S ARNr pertenecientes a *Methanocalculus halotolerans* fueron consideradas en los análisis filogenéticos de este trabajo. Sin embargo, los lazos evolutivos entre este organismo y las secuencias ahora reportadas parecieran ser poco probables dado que su colocación lo asocia más con metanógenos del Orden *Methanosarcinales*.

Por otra parte, la relación filogenética de secuencias asociadas al Phylum *Thermoplasmata* obtenidas en este trabajo con las previamente reportadas y a su vez con secuencias de organismos no cultivados pertenecientes al Orden *Methanomasicoccales*, tiene sentido dado

que en un principio este grupo de metanógenos metilotróficos dependientes de H<sub>2</sub> fue asociado a dicho Phylum gracias a su proximidad filogenética de 16S RNAr con grupos *Thermoplasmatales* termoacidófilos (Borrel et al., 2013).

En un inicio fue reportado el presunto hallazgo de copias del gen *mcrA* en genomas del Orden Grupo Bentónico Marino-D (MBG-D) (Paul et al., 2012), los cuales, representan la segunda fracción más abundante de *Euryarchaeota* en nuestras réplicas. Sin embargo, estudios genómicos posteriores confirmaron que los miembros de MBG-D no albergan *mcrA* y atribuyeron el hallazgo de dichas secuencias al entonces candidato, *Methanomassiliicoccales* (Borrel et al., 2013). Ahora se sabe que *Methanomassiliicoccales* comparte ascendencia con MBG-D (Borrel et al., 2013), y se encuentra filogenéticamente más cerca del Grupo Marino II (MG-II) que de cualquier otro Orden metanogénico reconocido a la fecha (Borrel et al., 2014b; Paul et al., 2012).

Los miembros de *Methanomassiliicoccales* participan en procesos de digestión anaeróbica (Dziewit et al., 2015), y sus características genómicas los infieren como potencialmente capaces de prosperar en suelos y sedimentos (Borrel et al., 2014b), por lo que existe una gran posibilidad de que dichas secuencias correspondan a dicho grupo.

Respecto a las secuencias asociadas al phylum *Bathyarchaeota*, existen evidencias de heterotrofia basada en la asimilación de materia orgánica como compuestos aromáticos o proteínas detríticas en este grupo, aunque, y como se mencionaba anteriormente, se encontraron homólogos divergentes de los genes necesarios para el metabolismo del metano en dos de sus genomas, lo que sugiere que los miembros de este filo pueden contribuir al ciclo del metano en sedimentos (Evans et al., 2015).

La filogenia obtenida a partir de las secuencias 16S de ARNr (Fig. 15), mostró una topología similar a los previamente reportados, al agrupar este linaje con individuos no cultivados de *Crenarchaeota*, en un clado externo a *Euryarchaeota*, puesto que pertenece al recién reconocido superphylum TACK. Sin embargo, dada la adquisición de diversas capacidades fisiológicas por parte de este grupo (Zhou et al., 2018), sería necesario el uso de un marcador genético funcional como *mcrA* o bien, la caracterización genómica de cultivos puros o

enriquecidos para profundizar respecto al papel ecológico de *Bathyarchaeota* en este entorno y si tiene o no relación con el metabolismo del metano los tapetes microbianos hipersalinos.

La aparente relación filogenética entre *Methanofastidiosales* y *Methanobacteriales*, quizá pudiera asociarse a las capacidades fisiológicas descritas en los tres géneros que componen a este Orden. Mientras que todas las especies de *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium* pueden utilizar  $H_2$  y  $CO_2$ , *Methanosphaera* hace uso exclusivo de  $H_2$  y metanol como sustrato para la metanogénesis (Lyu y Liu, 2019b).

No obstante, la creciente descripción de este tipo de metanógenos, además de sugerir que su diversidad y distribución es mucho mayor de lo que se anticipó anteriormente, señala su elevada heterogeneidad tanto filogenética como bioquímica, ya que entre los metanógenos metilotróficos dependientes de hidrogeno situados dentro de *Euryarchaeota*, además de los miembros de *Methanofastidiosales* y *Methanomassiliicoccales*, se encuentra *Methanosphaera stadtmanae* (perteneciente a *Methanobacteriales*; ), *Methanimicrococcus blatticola* (del Orden *Methanosarcinales*; Sprenger et al., 2000), *Methanonatronarchaeum thermophilum* y *Methanohalarchaeum thermophilum* (del Orden *Methanonatronarchaeales* (Sorokin et al., 2017) y evidencia de una gama, incluso más amplia, es aportada por un número creciente de genomas ensamblados de metagenomas correspondientes a organismos no cultivables (Borrel et al., 2019; Söllinger y Urich, 2019b).

Aún en abundancias menores al 0.1% del total de las comunidades microbianas que constituyen los tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, las arqueas metanogénicas desempeñan un papel esencial para su funcionamiento, estabilidad y resiliencia actuando como reservorios casi ilimitados de diversidad genética y funcional e impulsando los ciclos biogeoquímicos a escala global. Queda claro que para confirmar y ampliar el conocimiento acerca de la diversidad y distribución de arqueas con un metabolismo metilotrófico dependiente de hidrogeno en los ambientes hipersalinos, es esencial abordar el estudio de estas comunidades a través de la secuenciación de genes funcionales como el *mcrA*, contemplando que muchos cebadores de uso común, como los dirigidos al gen de 16S ARNr, pueden pasar por alto linajes completos, sobre todo en este tipo de entornos en las que los metanógenos son una minoría incluso en la población general de arqueas (Narihito y Sekiguchi, 2017).

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo destacan la gran diversidad de las comunidades microbianas que albergan los tapetes hipersalinos de ESSAA4N1 y ESSAA5N4 en Guerrero Negro, Baja California Sur. Donde, además de los grupos dominantes, se detectó un alto número de ASVs con baja abundancia relativa, cuya fisiología es desconocida hasta el momento.

El presente trabajo contribuye hacia la comprensión de las diferentes rutas metabólicas metanogénicas presentes en ecosistemas hipersalinos, a través de la identificación de taxones metanógenos recientemente asociados con el metabolismo metilotrófico dependiente de hidrógeno de los grupos *Methanofastidiosa* y *Bathyarchaeia*, sugiriendo así que las condiciones de alta salinidad pueden no ser un factor limitante para este metabolismo.

La reconstrucción del proceso sintrófico potencialmente asociado a la degradación completa de la materia orgánica que resulta en biogás (metano, dióxido de carbono e hidrógeno), permitió especular sobre la contribución funcional y posibles interacciones interespecíficas de los metanógenos metilotróficos dependientes de hidrogeno en los tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, Baja California Sur.

Los conocimientos adquiridos a partir de este estudio proporcionan información de referencia útil para futuras exploraciones con relación a la diversidad filogenética y funcional de microorganismos con baja abundancia relativa asociados a la metanogénesis en tapetes microbianos hipersalinos.

Dado que la distribución y actividad de los metanógenos están condicionadas, además de factores fisicoquímicos, por la interacción ecológica con otros gremios microbianos, el enriquecimiento con sustratos no competitivos y la secuenciación de alto rendimiento del gen funcional *mcrA*, permitirá distinguir las vías metanogénicas más representativas en entornos hipersalinos, haciendo especial énfasis en la detección de metilotrofia dependiente de hidrógeno.

Indudablemente, estudiar las comunidades microbianas de los tapetes hipersalinos de Guerrero Negro desde un enfoque metagenómico funcional (vía secuenciación *shotgun*), permitirá ampliar el entendimiento de los procesos biológicos subyacentes desde una perspectiva de la

biología de sistemas y la potencial contribución de taxones de baja abundancia relativa en los sitios de muestreo. Dicha aproximación, podría además revelar nuevas concepciones de la diversidad filogenética y funcional de microorganismos no cultivables en los tapetes microbianos de Guerrero Negro, Baja California Sur, así como características emergentes de estas comunidades con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

## 10. LITERTATURA CITADA

- Abdul Rahman, N., Parks, D.H., Vanwonterghem, I., Morrison, M., Tyson, G.W., Hugenholtz, P. (2016). A phylogenomic analysis of the bacterial Phylum *Fibrobacteres*. *Front Microbiol* 6, 1469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01469>
- Abed, R.M.M., Kohls, K., Palinska, K.A., Golubic, S. (2010). Diversity and role of cyanobacteria and aerobic heterotrophic microorganisms in carbon cycling in arid cyanobacterial mats. In: Seckbach, J., Oren, A. (Eds.), *Microbial mats: modern and ancient microorganisms in stratified systems, cellular origin, life in extreme habitats and Astrobiology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 253–273. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2_13)
- Adam, P.S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S. (2017). The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution, and ecology. *ISME J* 11, 2407–2425. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122>
- Almela, P., Justel, A., Quesada, A. (2021). Heterogeneity of microbial communities in soils from the Antarctic Peninsula region. *Front Microbiol* 12, 628792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628792>
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- Anderson, M. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Aust J Ecol* 26, 2–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.tb00081.x>
- Andrei, A.Ş., Banciu, H.L., Oren, A. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett* 330, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>
- Auguet, J.-C., Barberan, A., Casamayor, E.O. (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J* 4, 182–190. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.109>
- Bapteste, É., Brochier, C., Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1, 353–363. <https://doi.org/10.1155/2005/859728>
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., Pace, N.R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *PNAS* 93, 9188–9193. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9188>

- Barrett, E.L., Kwan, H.S. (1985). Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annu Rev Microbiol* 39, 131–149. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001023>
- Bebout, B.M., Carpenter, S.P., Des Marais, D.J., Discipulo, M., Embaye, T., Garcia-Pichel, F., Hoehler, T.M., Hogan, M., Jahnke, L.L., Keller, R.M., Miller, S.R., Prufert-Bebout, L.E., Raleigh, C., Rothrock, M., Turk, K. (2002). Long-term manipulations of intact microbial mat communities in a greenhouse collaboratory: simulating Earth's present and past field environments. *Astrobiology* 2, 383–402. <https://doi.org/10.1089/153110702762470491>
- Ben Hania, W., Joseph, M., Bunk, B., Spröer, C., Klenk, H.-P., Fardeau, M.-L., Spring, S. (2017). Characterization of the first cultured representative of a *Bacteroidetes* clade specialized on the scavenging of cyanobacteria. *Environ Microbiol* 19, 1134–1148. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13639>
- Bent, S.J., Forney, L.J. (2008). The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* 2, 689–695. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.44>
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W.H., Say, R.F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B.E., Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol* 8, 447–460. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2365>
- Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J. (2009). High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J* 3, 314–325. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110>
- Berghuis, B.A., Yu, F.B., Schulz, F., Blainey, P.C., Woyke, T., Quake, S.R. (2019). Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum *Verstraetearchaeota* reveals the shared ancestry of all methanogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 5037–5044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815631116>
- Berlanga, M., Aas, J.A., Paster, B.J., Boumenna, T., Dewhirst, F.E., Guerrero, R. (2008). Phylogenetic diversity and temporal variation in the *Spirochaeta* populations from two Mediterranean microbial mats. *Int Microbiol* 11, 267–274. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.71>
- Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R., Fredricks, H.F., Elvert, M., Kelly, T.J., Schrag, D.P., Sogin, M.L., Brenchley, J.E., Teske, A., House, C.H., Hinrichs, K.-U. (2006). Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *PNAS* 103, 3846–3851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600035103>

- Bižić, M., Klintzsch, T., Ionescu, D., Hindiyeh, M.Y., Günthel, M., Muro-Pastor, A.M., Eckert, W., Urich, T., Keppler, F., Grossart, H.-P. (2019). Cyanobacteria, the most ancient and abundant photoautotrophs on Earth produce the greenhouse gas methane during photosynthesis. bioRxiv 398958. <https://doi.org/10.1101/398958>
- Bižić-Ionescu, M., Klintzsch, T., Ionescu, D., Hindiyeh, M.Y., Günthel, M., Muro-Pastor, A.M., Eckert, W., Keppler, F., Grossart, H.-P. (2019). Widespread methane formation by *Cyanobacteria* in aquatic and terrestrial ecosystems. bioRxiv 398958. <https://doi.org/10.1101/398958>
- Bolhuis, H., Cretoiu, M.S., Stal, L.J. (2014). Molecular ecology of microbial mats. FEMS Microbiology Ecology 90, 335–350. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12408>
- Borrel, G., Adam, P.S., Gribaldo, S. (2016). Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway: An Ancient, Versatile, and Fragile Association. Genome Biol Evol 8, 1706–1711. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw114>
- Borrel, G., Adam, P.S., McKay, L.J., Chen, L.-X., Sierra-García, I.N., Sieber, C.M.K., Letourneur, Q., Ghoulane, A., Andersen, G.L., Li, W.-J., Hallam, S.J., Muyzer, G., de Oliveira, V.M., Inskeep, W.P., Banfield, J.F., Gribaldo, S. (2019). Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. Nature Microbiology 4, 603–613. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0363-3>
- Borrel, G., Gaci, N., Peyret, P., O'Toole, P.W., Gribaldo, S., Brugère, J.-F. (2014a). Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7th order of methanogens: implications for the evolution of a genetic code expansion cassette. Archaea 2014, 374146. <https://doi.org/10.1155/2014/374146>
- Borrel, G., McCann, A., Deane, J., Neto, M.C., Lynch, D.B., Brugère, J.-F., O'Toole, P.W. (2017). Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing Archaea in the human gut microbiome. ISME J 11, 2059–2074. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.72>
- Borrel, G., O'Toole, P.W., Harris, H.M.B., Peyret, P., Brugère, J.-F., Gribaldo, S. (2013). Phylogenomic data support a seventh Order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. GBE 5, 1769–1780. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt128>
- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H.M.B., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., Bardot, O., Raymann, K., Gribaldo, S., Peyret, P., O'Toole, P.W., Brugère, J.-F. (2014b). Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related

- seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 15, 679. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-679>
- Cadena, S., García-Maldonado, J.Q., López-Lozano, N.E., Cervantes, F.J. (2018). Methanogenic and sulfate-reducing activities in a hypersaline microbial mat and associated microbial diversity. *Microb Ecol* 75, 930–940. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1104-x>
- Cai, M., Liu, Y., Zhou, Z., Yang, Y., Pan, J., Gu, J.-D., Li, M. (2018). Asgard archaea are diverse, ubiquitous, and transcriptionally active microbes [Preprint.] July 23, 2018. Available from: <https://doi.org/10.1101/374165>
- Cai, M., Richter-Heitmann, T., Yin, X., Huang, W.-C., Yang, Y., Zhang, C., Duan, C., Pan, J., Liu, Yang, Liu, Yue, Friedrich, M.W., Li, M. (2021). Ecological features and global distribution of Asgard archaea. *Sci Total Environ* 758, 143-581. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143581>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pěa, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carr, S.A., Schubotz, F., Dunbar, R.B., Mills, C.T., Dias, R., Summons, R.E., Mandernack, K.W. (2018). Acetoclastic *Methanosaeta* are dominant methanogens in organic-rich Antarctic marine sediments. *ISME J* 12, 330–342. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.150>
- Chen, L.-X., Méndez-García, C., Dombrowski, N., Servín-Garcidueñas, L.E., Eloë-Fadrosh, E.A., Fang, B.-Z., Luo, Z.-H., Tan, S., Zhi, X.-Y., Hua, Z.-S., Martínez-Romero, E., Woyke, T., Huang, L.-N., Sánchez, J., Peláez, A.I., Ferrer, M., Baker, B.J., Shu, W.-S. (2018). Metabolic versatility of small archaea *Micrarchaeota* and *Parvarchaeota*. *ISME J* 12, 756–775. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0002-z>
- Cheng, T.-W., Chang, Y.-H., Tang, S.-L., Tseng, C.-H., Chiang, P.-W., Chang, K.-T., Sun, C.-H., Chen, Y.-G., Kuo, H.-C., Wang, C.-H., Chu, P.-H., Song, S.-R., Wang, P.-L., Lin, L.-H. (2012). Metabolic stratification driven by surface and subsurface interactions in a terrestrial mud volcano. *ISME J* 6, 2280–2290. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.61>

- Clarke, K. (1993). Nonparametric Multivariate Analyses of Changes in Community Structure. *Austral Ecol* 18, 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>
- Clements, F.E. (1916). *Plant succession; an analysis of the development of vegetation*. Carnegie Institution of Washington, Washington. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.56234>
- Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microb Ecol* 28, 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00575.x>
- Costa, K.C., Wong, P.M., Wang, T., Lie, T.J., Dodsworth, J.A., Swanson, I., Burn, J.A., Hackett, M., Leigh, J.A. (2010). Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase. *PNAS* 107, 11050–11055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003653107>
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. (2004). Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* 7, 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.010>
- Dahllöf, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 13, 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00314-2)
- de la Cuesta-Zuluaga, J., Spector, T.D., Youngblut, N.D., Ley, R.E. (2020). Genomic insights into adaptations of TMA-utilizing methanogens to diverse habitats including the human gut [Preprint]. September 18, 2020. *Microb* <https://doi.org/10.1101/2020.09.17.302828>
- Decho, A.W., Visscher, P.T., Reid, R.P. (2005). Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 219, 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.10.015>
- Demergasso, C., Casamayor, E.O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol* 48, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.013>
- Des Marais, D.J. (2003). Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biol Bull Rev* 204, 160–167. <https://doi.org/10.2307/1543552>
- Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., Teske, A. (2005). Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A

- (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* 71, 4592–4601. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4592-4601.2005>
- Dolfing, J., Tiedje, J.M. (1988). Acetate inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation. *Appl Environ Microbiol* 54, 1871–1873. <https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1871-1873.1988>
- Dong, H., Zhang, G., Jiang, H., Yu, B., Chapman, L.R., Lucas, C.R., Fields, M.W. (2006). Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology. *Microb Ecol* 51, 65–82. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0228-6>
- Dridi, B., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Raoult, D., Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1902–1907. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0>
- Dziewit, L., Pyzik, A., Romaniuk, K., Sobczak, A., Szczesny, P., Lipinski, L., Bartosik, D., Drewniak, L. (2015). Novel molecular markers for the detection of methanogens and phylogenetic analyses of methanogenic communities. *Front Microbiol* 6, 694. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00694>
- Eren, A.M., Maignien, L., Sul, W.J., Murphy, L.G., Grim, S.L., Morrison, H.G., Sogin, M.L. (2013). Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods Ecol and Evol* 4, 1111–1119. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12114>
- Evans, P.N., Boyd, J.A., Leu, A.O., Woodcroft, B.J., Parks, D.H., Hugenholtz, P., Tyson, G.W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nat Rev Microbiol* 17, 219–232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- Evans, P.N., Parks, D.H., Chadwick, G.L., Robbins, S.J., Orphan, V.J., Golding, S.D., Tyson, G.W., (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350, 434–438. <https://doi.org/10.1126/science.aac7745>
- Fernandez, A.B., Rasuk, M.C., Visscher, P.T., Contreras, M., Novoa, F., Poire, D.G., Patterson, M.M., Ventosa, A., Farias, M.E. (2016). Microbial diversity in sediment ecosystems (evaporites domes, microbial mats, and crusts) of hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Front Microbiol* 7, 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01284>
- Ferry, J.G. (2011). Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Curr Opin Biotechnol* 22, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.011>

- Fillol, M., Auguet, J.-C., Casamayor, E.O., Borrego, C.M. (2016). Insights in the ecology and evolutionary history of the Miscellaneous Crenarchaeotic Group lineage. *ISME J* 10, 665–677. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.143>
- Fracek, S.P., Stolz, J.F. (1985). *Spirochaeta bajacaliforniensis* sp. n. from a microbial mat community at Laguna Figueroa, Baja California Norte, Mexico. *Arch Microbiol* 142, 317–325. <https://doi.org/10.1007/BF00491897>
- Gaci, N., Borrel, G., Tottey, W., O'Toole, P.W., Brugère, J.-F. (2014). Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol* 20, 16062–16078. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16062>
- Gagen, E.J., Huber, H., Meador, T., Hinrichs, K.-U., Thomm, M. (2013). Novel Cultivation-Based Approach to Understanding the Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) Archaea from Sedimentary Ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 79, 6400–6406. <https://doi.org/10.1128/AEM.02153-13>
- García-Maldonado, J., Bebout, B., Celis, L., López-Cortés, A., (2012). Phylogenetic diversity of methyl-coenzyme M reductase (mcrA) gene and methanogenesis from trimethylamine in hypersaline environments. *Int Microbiol: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 15, 33–41. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.155>
- García-Maldonado, J., Bebout, B., Everroad, R., López-Cortés, A. (2014). Evidence of novel phylogenetic lineages of methanogenic Archaea from hypersaline microbial mats. *Microb Ecol* 69. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0473-7>
- García-Maldonado, J., Escobar, A., Raggi, L., Bebout, B., Sanchez-Flores, A., López-Cortés, A. (2018). Bacterial and archaeal profiling of hypersaline microbial mats and endoevaporites, under natural conditions and methanogenic microcosm experiments. *Extremophiles* 22. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1047-2>
- Garrity, G., Boone, D.R., Castenholz, R.W. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Gribaldo, S., Brochier-Armanet, C. (2006). The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1007–1022. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1841>
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., DeLong, E.F. (2003). Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing

Archaea. Appl Environ Microbiol 69, 5483–5491.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003>

Harris, J.K., Caporaso, J.G., Walker, J.J., Spear, J.R., Gold, N.J., Robertson, C.E., Hugenholtz, P., Goodrich, J., McDonald, D., Knights, D., Marshall, P., Tufo, H., Knight, R., Pace, N.R. (2013). Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *ISME J* 7, 50–60. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.79>

He, Y., Li, M., Perumal, V., Feng, X., Fang, J., Xie, J., Sievert, S.M., Wang, F. (2016). Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nat Microbiol* 1, 16035. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.35>

Hedderich, R., Whitman, W.B., 2013. Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In: Rosenberg, Eugene DeLong, E.F., Stackebrandt, E., Lory, S., Thompson, F. (Eds.) *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* 635–662. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4\\_81](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_81)

Helling, C.S., Chesters, G., Corey, R.B. (1964). Contribution of organic matter and clay to soil cation- exchange capacity as affected by the pH of the saturating solution. Presented at SSSAJ 28, 4: 517-520 <https://doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800040020x>

Hendrickson, E.L., Kaul, R., Zhou, Y., Bovee, D., Chapman, P., Chung, J., Conway de Macario, E., Dodsworth, J.A., Gillett, W., Graham, D.E., Hackett, M., Haydock, A.K., Kang, A., Land, M.L., Levy, R., Lie, T.J., Major, T.A., Moore, B.C., Porat, I., Palmeiri, A., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Söll, D., Van Dien, S., Wang, T., Whitman, W.B., Xia, Q., Zhang, Y., Larimer, F.W., Olson, M.V., Leigh, J.A. (2004). Complete genome sequence of the genetically tractable hydrogenotrophic methanogen *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* 186, 6956–6969. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6956-6969.2004>

Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A., Moffett, B.F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microb Ecol* 43, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x>

Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., Clark, I.M., 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol Biochem* 42, 878–887. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.019>

Holmkvist, L., Ferdeman, T.G., Jørgensen, B.B. (2011). A cryptic sulfur cycle driven by iron in the methane zone of marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 3581–3599. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.03.033>

- Hügler, M., Sievert, S.M. (2011). Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Ann Rev Mar Sci* 3, 261–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142712>
- Iino, T., Tamaki, H., Tamazawa, S., Ueno, Y., Ohkuma, M., Suzuki, K., Igarashi, Y., Haruta, S. (2013). *Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccales* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the Class Thermoplasmata. *Microbes Environ* 28, 244–250. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12189>
- Inagaki, F., Kuypers, M.M.M., Tsunogai, U., Ishibashi, J.-I., Nakamura, K.-I., Treude, T., Ohkubo, S., Nakaseama, M., Gena, K., Chiba, H., Hirayama, H., Nunoura, T., Takai, K., Jørgensen, B.B., Horikoshi, K., Boetius, A. (2006). Microbial community in a sediment-hosted CO<sub>2</sub> Lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 14164–14169. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606083103>
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K.H., Horikoshi, K. (2003). Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk. *Appl Environ Microbiol* 69, 7224–7235. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7224-7235.2003>
- Janssen, P.H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>
- Javor, B. (1989). *Hypersaline Environments: Microbiology and Biogeochemistry*, Brock Springer Series in Contemporary Bioscience. Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-74370-2>
- Jones, S.E., Lennon, J.T. (2010). Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *PNAS* 107, 5881–5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107>
- Jørgensen, B., Cohen, Y., Des Marais, D. (1987). Photosynthetic action spectra and adaptation to spectral light distribution in a benthic cyanobacterial mat. *Appl Environ Microbiol* 53: 879–886. *Appl Environ Microbiol* 53, 879–86. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.4.879-886.1987>
- Kallistova, A., Merkel, A., Kanapatskiy, T., Boltyanskaya, Y., Tarnovetskii, I., Perevalova, A., Kevbrin, V., Samylina, O., Pimenov, N. (2020). Methanogenesis in the Lake Elton saline

aquatic system. *Extremophiles* 24, 657–672. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01185-x>

Kallistova, A., Merkel, A., Tarnovetskii, I., Pimenov, N. (2017). Methane Formation and Oxidation by Prokaryotes. *Microb* 86, 671–691. <https://doi.org/10.1134/S0026261717060091>

Kamat, S.S., Williams, H.J., Dangott, L.J., Chakrabarti, M., Raushel, F.M. (2013). The catalytic mechanism for aerobic formation of methane by Bacteria. *Nature* 497, 132–136. <https://doi.org/10.1038/nature12061>

Kamprath, E.J., Welch, C.D. (1962). Retention and cation-exchange properties of organic matter in coastal plain soils. *SSSA J* 26, 263–265. <https://doi.org/10.2136/sssaj1962.03615995002600030021x>

Kaster, A.-K., Moll, J., Parey, K., Thauer, R.K. (2011). Coupling of ferredoxins and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *PNAS* 108, 2981–2986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016761108>

Katayama, T., Yoshioka, H., Takahashi, H.A., Amo, M., Fujii, T., Sakata, S. (2016). Changes in microbial communities associated with gas hydrates in subseafloor sediments from the Nankai Trough. *FEMS Microbiol Ecol* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw093>

Kelley, C.A., Chanton, J.P., Bebout, B.M. (2015). Rates and pathways of methanogenesis in hypersaline environments as determined by <sup>13</sup>C-labeling. *Biogeochemistry* 126, 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10533-015-0161-9>

King, G.M. (1988a). Methanogenesis from Methylated Amines in a Hypersaline Algal Mat. *Appl Environ Microbiol* 54, 130–136. [doi: 10.1128/aem.54.1.130-136.1988](https://doi.org/10.1128/aem.54.1.130-136.1988)

King, G.M., Klug, M.J., Lovley, D.R. (1983). Metabolism of Acetate, Methanol, and Methylated Amines in Intertidal Sediments of Lowes Cove, Maine. *Appl Environ Microbiol* 45, 1848–1853. [doi: 10.1128/aem.45.6.1848-1853.1983](https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1848-1853.1983)

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol* 25, 415–420. <https://doi.org/10.1139/m79-063>

Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME J* 3, 1223–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88>

- Kubo, K., Lloyd, K.G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., Knittel, K. (2012). Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse, and widespread in marine sediments. *ISME J* 6, 1949–1965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.37>
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 12, 118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x>
- Lane, N., Martin, W.F. (2012). The origin of membrane bioenergetics. *Cell* 151, 1406–1416. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.050>
- Lang, K., Schuldes, J., Klingl, A., Poehlein, A., Daniel, R., Brune, A. (2015). New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*.” *Appl Environ Microbiol* 81, 1338–1352. <https://doi.org/10.1128/AEM.03389-14>
- Lazar, C.S., Baker, B.J., Seitz, K., Hyde, A.S., Dick, G.J., Hinrichs, K.-U., Teske, A.P. (2016). Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of *Bathymarchaeota* in estuarine sediments. *Environ Microbiol* 18, 1200–1211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13142>
- Lee, J., Burow, L., Woebken, D., Everroad, R., Kubo, M., Spormann, A., Weber, P., Pett-Ridge, J., Bebout, B., Hoehler, T. (2014). Fermentation couples *Chloroflexi* and sulfate-reducing bacteria to *Cyanobacteria* in hypersaline microbial mats. *Frontiers in Microbiology* 5, 61. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00061>
- Lee, Y.M., Hwang, K., Lee, J.I., Kim, M., Hwang, C.Y., Noh, H.-J., Choi, H., Lee, H.K., Chun, J., Hong, S.G., Shin, S.C. (2018). Genomic insight into the predominance of Candidate Phylum *Atribacteria* JS1 lineage in marine sediments. *Front Microbiol* 9, 2909. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02909>
- Lenhart, K., Bunge, M., Ratering, S., Neu, T.R., Schüttmann, I., Greule, M., Kammann, C., Schnell, S., Müller, C., Zorn, H., Keppler, F. (2012). Evidence for methane production by saprotrophic fungi. *Nat Commun* 3, 1046. <https://doi.org/10.1038/ncomms2049>
- Ley, R.E., Harris, J.K., Wilcox, J., Spear, J.R., Miller, S.R., Bebout, B.M., Maresca, J.A., Bryant, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (2006). Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 72, 3685–3695. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3685-3695.2006>
- Li, Y., Leahy, S.C., Jeyanathan, J., Henderson, G., Cox, F., Altermann, E., Kelly, W.J., Lambie, S.C., Janssen, P.H., Rakonjac, J., Attwood, G.T. (2016). The complete genome sequence of the

- methanogenic archaeon ISO4-H5 provides insights into the methylotrophic lifestyle of a ruminal representative of the *Methanomassiliicoccales*. *Stand Genomic Sci* 11. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0183-5>
- Lie, T.J., Costa, K.C., Lupa, B., Korpole, S., Whitman, W.B., Leigh, J.A. (2012). Essential anaplerotic role for the energy-converting hydrogenase Eha in hydrogenotrophic methanogenesis. *PNAS* 109, 15473–15478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208779109>
- Liu, J., Chen, H., Zhu, Q., Shen, Y., Wang, X., Wang, M., Peng, C. (2015). A novel pathway of direct methane production and emission by eukaryotes including plants, animals, and fungi: An overview. *Atmosph Environ* 115, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.05.019>
- Liu, X., Li, M., Castelle, C.J., Probst, A.J., Zhou, Z., Pan, J., Liu, Y., Banfield, J.F., Gu, J.-D. (2018). Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineages. *Microbiome* 6, 102. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0488-2>
- Liu, Y., Priscu, J.C., Xiong, J., Conrad, R., Vick-Majors, T., Chu, H., Hou, J. (2016). Salinity drives archaeal distribution patterns in high altitude lake sediments on the Tibetan Plateau. *FEMS Microb Ecol* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw033>
- Liu, Y., Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Ann NY Acad Sci* 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Lloyd, K.G., Schreiber, L., Petersen, D.G., Kjeldsen, K.U., Lever, M.A., Steen, A.D., Stepanauskas, R., Richter, M., Kleindienst, S., Lenk, S., Schramm, A., Jørgensen, B.B. (2013). Predominant Archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* 496, 215–218. <https://doi.org/10.1038/nature12033>
- López-Cortés, A. (1990). Microbial mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, Mexico. *Geomicrobiol J* 8, 69–85. <https://doi.org/10.1080/01490459009377881>
- Lozupone, C., Knight, R. (2006). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 71, 8228–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Lueders, T., Chin, K.-J. (Kuki), Conrad, R., Friedrich, M. (2001). Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (mcrA) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol* 3, 194–204. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00179.x>

- Lyu, Z., Liu, Y. (2019). Diversity and taxonomy of methanogens, in: Stams, A.J.M., Sousa, D.Z. (Eds.), *Biogenesis of Hydrocarbons, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 19–77. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_5)
- Lyu, Z., Lu, Y. (2018). Metabolic shift at the class level sheds light on adaptation of methanogens to oxidative environments. *ISME J* 12, 411–423. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.173>
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., Whitman, W. (2018). Methanogenesis. *Curr Biol* 28. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>
- Magurran, A.E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Wiley. ISBN: 978-1-118-68792-5
- McGenity, T.J., Sorokin, D.Y. (2019). Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments, in: Stams, A.J.M., Sousa, D.Z. (Eds.), *Biogenesis of Hydrocarbons, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 283–309. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_12)
- McMurdie, P.J., Holmes, S. (2015). Shiny-phyloseq: Web application for interactive microbiome analysis with provenance tracking. *Bioinformatics* 31, 282–283. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu616>
- Megyés, M., János, M., Strat, D., Borsodi, A. (2021). Bacterial and archaeal taxonomic diversity of mud volcanoes (Beciu, Romania) via metagenomic approach. *Geomicrobiol J* 38, 1–8. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1900460>
- Muyzer, G., Stams, A. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6: 441–454. *Nature Rev Microbiol* 6, 441–54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Nakamura, Kohei, Takahashi, A., Mori, C., Tamaki, H., Mochimaru, H., Nakamura, Kazunori, Takamizawa, K., Kamagata, Y. (2013). *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic, thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 715–722. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.041681-0>
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., Summers, A.O. (2004). Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *PNAS* 101, 7118–7122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306466101>
- Narihiro, T., Sekiguchi, Y. (2017). Primers: functional genes and 16S rRNA genes for methanogens, in: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B. (Eds.), *Hydrocarbon and Lipid*

- Microbiology Protocols: Primers*, Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 79–139. <https://doi.org/10.1007/8623> 2015 138
- Nobu, M.K., Narihiro, T., Kuroda, K., Mei, R., Liu, W.-T. (2016). Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. *ISME J* 10, 2478–2487. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.33>
- Nobu, M.K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S.G., Woyke, T., Liu, W.-T. (2015). Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME J* 9, 1710–1722. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.256>
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O’Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Wagner, H. (2013). *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version. 2.0-10. CRAN.
- Oremland, R.S., Marsh, L.M., Polcin, S. (1982). Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature* 296, 143–145. <https://doi.org/10.1038/296143a0>
- Oren, A. (2013). *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett* 342, 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12094>
- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* 13, 1908–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x>
- Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00900.x>
- Oren, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 334–348.
- Orphan, V.J., Jahnke, L.L., Embaye, T., Turk, K.A., Pernthaler, A., Summons, R.E., DES Marais, D.J. (2008). Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. *Geobiol* 6, 376–393. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00166.x>
- O’Sullivan, L.A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A.J., Fry, J.C. (2006). Culturable phylogenetic diversity of the phylum “*Bacteroidetes*” from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family *Flavobacteriaceae*: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 169–180. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63941-0>
- Oyewusi, H.A., Abdul Wahab, R., Edbeib, M.F., Mohamad, M.A.N., Abdul Hamid, A.A., Kaya, Y., Huyop, F. (2021). Functional profiling of bacterial communities in Lake Tuz using 16S

- rRNA gene sequences. *Biotechnol Equip* 35, 1–10. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1840437>
- Paerl, H.W., Kuparinen, J. (2003). Aggregates and consortia, microbial. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. ACS J. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env137>
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., Steppe, T.F., 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ Microbiol* 2, 11–26. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00071.x>
- Paerl, H.W., Yannarell, A.C. (2010). Environmental dynamics, community structure and function in a hypersaline microbial mat, in: Seckbach, J., Oren, A. (Eds.), *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 421–442. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2_22)
- Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L., Brune, A. (2012). “*Methanoplasmatales*,” Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 78, 8245–8253. <https://doi.org/10.1128/AEM.02193-12>
- Pinckney, J., Paerl, H., Fitzpatrick, M. (1995). Impacts of seasonality and nutrients on microbial mat community structure and function. *Mar Ecol Prog Ser* 123, 207–216. <https://doi.org/10.3354/meps123207>
- Portillo, M.C., Leff, J.W., Lauber, C.L., Fierer, N. (2013). Cell size distributions of soil bacterial and archaeal taxa. *Appl Environ Microbiol* 79, 7610–7617. <https://doi.org/10.1128/AEM.02710-13>
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS ONE* 5, e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rasuk, M.C., Fernández, A.B., Kurth, D., Contreras, M., Novoa, F., Poiré, D., Farías, M.E. (2016). Bacterial diversity in microbial mats and sediments from the Atacama Desert. *Microb Ecol* 71, 44–56. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0649-9>

- Repeta, D.J., Ferrón, S., Sosa, O.A., Johnson, C.G., Repeta, L.D., Acker, M., DeLong, E.F., Karl, D.M., (2016). Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nature Geosci* 9, 884–887. <https://doi.org/10.1038/ngeo2837>
- Ricotta, C. (2005). Through the Jungle of Biological Diversity. *Acta Biotheor* 53, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10441-005-7001-6>
- Robertson, C.E., Spear, J.R., Harris, J.K., Pace, N.R. (2009). Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 75, 1801–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.01811-08>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open-source tool for metagenomics. *PeerJ* 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Schink, B., Stams, A.J.M. (2013). Syntrophism among prokaryotes, In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 471–493. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0\\_59](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_59)
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12, R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Shade, A. (2017). Diversity is the question, not the answer. *ISME J* 11, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.118>
- Smith, J.M., Green, S.J., Kelley, C.A., Prufert-Bebout, L., Bebout, B.M. (2008). Shifts in methanogen community structure and function associated with long-term manipulation of sulfate and salinity in a hypersaline microbial mat. *Environ Microbiol* 10, 386–394. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01459.x>
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Söllinger, A., Schwab, C., Weinmaier, T., Loy, A., Tveit, A.T., Schleper, C., Urich, T. (2016). Phylogenetic and genomic analysis of Methanomassiliicoccales in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. *FEMS Microbiol Ecol* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv149>

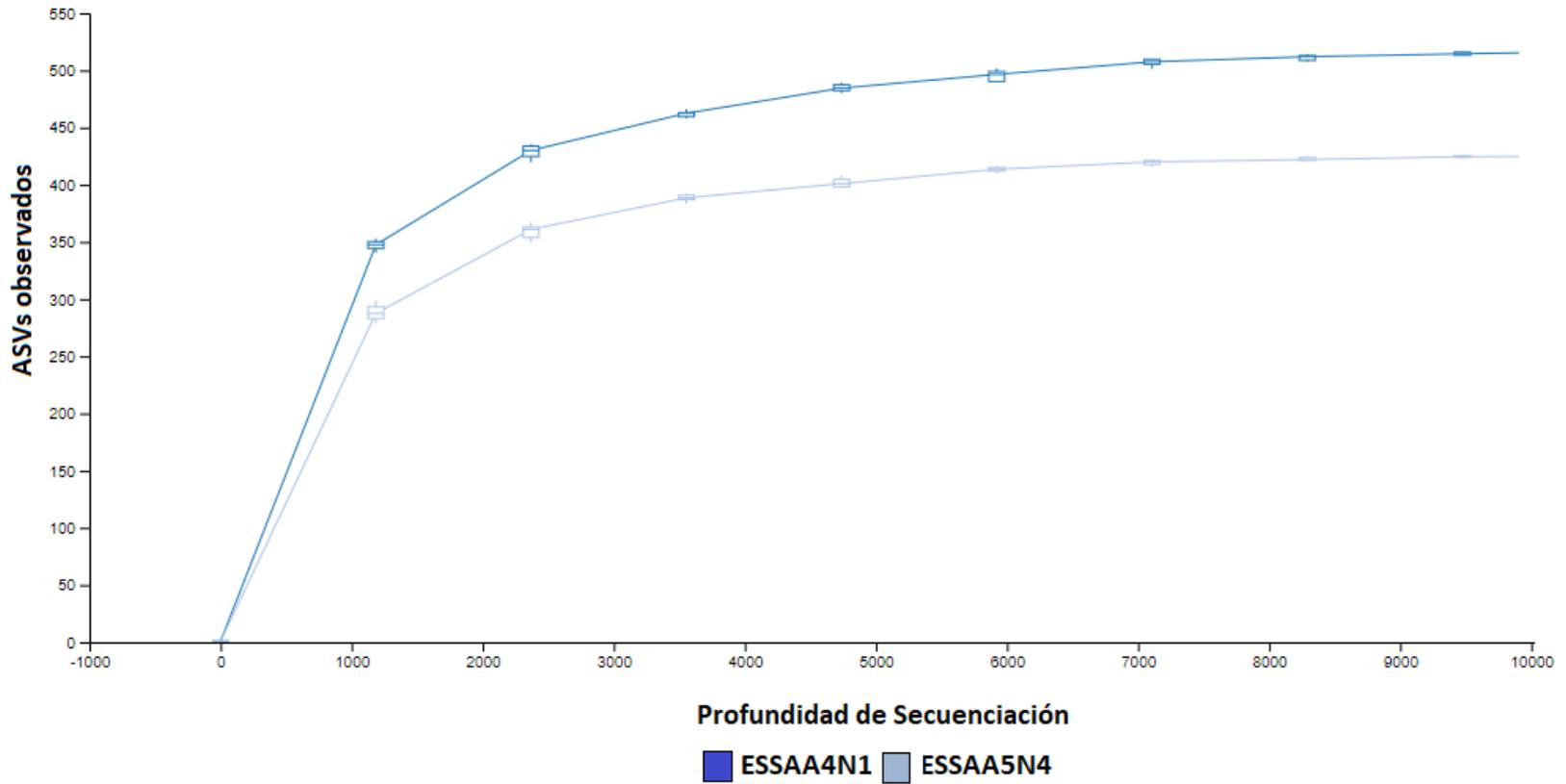
- Söllinger, A., Urich, T. (2019). Methylophilic methanogens everywhere — physiology and ecology of novel players in global methane cycling. *Biochemical Society Transactions* 47, 1895–1907. <https://doi.org/10.1042/BST20180565>
- Sørensen, K.B., Canfield, D.E., Teske, A.P., Oren, A. (2005). Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 71, 7352–7365. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7352-7365.2005>
- Sorokin, D.Y., Makarova, K.S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P.N., Galinski, E.A., Ciordia, S., Mena, M.C., Merkel, A.Y., Wolf, Y.I., van Loosdrecht, M.C.M., Koonin, E.V. (2017). Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol* 2, 17081. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.81>
- Spang, A., Caceres, E.F., Ettema, T.J.G. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* 357. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3883>
- Sprenger, W.W., van Belzen, M.C., Rosenberg, J., Hackstein, J.H., Keltjens, J.T. (2000). *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 pt 6, 1989–1999. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-1989>
- Stal, L., Caumette, P. (1994). *Microbial Mats: structure, development and environmental significance*, Nato ASI Subseries G: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-78991-5>
- Stal, L.J. (2012). Cyanobacterial Mats and Stromatolites. In: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 65–125. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_4)
- Stams, A.J.M., Sousa, D.Z. (2019). *Biogenesis of Hydrocarbons, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2>
- Stivaletta, N., Barbieri, R., Cevenini, F., López-García, P. (2011). Physicochemical conditions and microbial diversity associated with the evaporite deposits in the Laguna de la Piedra (Salar de Atacama, Chile). *Geomicrobiol J* 28, 83–95. <https://doi.org/10.1080/01490451003653102>
- Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R.K., Schmidt, T.M. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for

- future development. *Nucleic Acids Res* 43, D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Swan, B.K., Ehrhardt, C.J., Reifel, K.M., Moreno, L.I., Valentine, D.L. (2010). Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Appl Environ Microbiol* 76, 757–768. <https://doi.org/10.1128/AEM.02409-09>
- Takai, K., Horikoshi, K. (1999). Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics* 152, 1285–1297. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.4.1285>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thauer, R.K. (2012). The Wolfe cycle comes full circle. *PNAS* 109, 15084–15085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213193109>
- Thauer, R.K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 6, 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>
- Thauer, R.K.Y. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson: Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiol* 144, 2377–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2377>
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tveit, A., Schwacke, R., Svenning, M.M., Urich, T. (2013). Organic carbon transformations in high-Arctic peat soils: key functions and microorganisms. *ISME J* 7, 299–311. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.99>
- van Gemerden, H. (1993). Microbial mats: A joint venture. *Marine Geology, Marine sediments, burial, pore water Chemistry, Microbiology and Diagenesis* 113, 3–25. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(93\)90146-M](https://doi.org/10.1016/0025-3227(93)90146-M)
- Vanwonterghem, I., Evans, P.N., Parks, D.H., Jensen, P.D., Woodcroft, B.J., Hugenholtz, P., Tyson, G.W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nat Microbiol* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>

- Vishnivetskaya, T.A., Fisher, L.S., Brodie, G.A., Phelps, T.J. (2013). Microbial communities involved in biological ammonium removal from coal combustion wastewaters. *Microb Ecol* 66, 49–59. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0152-5>
- Visscher, P.T., Stolz, J.F. (2005). Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 219, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.10.016>
- Visscher, P.T., van Gemerden, H. (1993). Sulfur cycling in laminated marine microbial ecosystems. In: Oremland, R.S. (Ed.), *Biogeochemistry of Global Change: Radiatively Active Trace Gases Selected Papers from the Tenth International Symposium on Environmental Biogeochemistry, San Francisco*, August 19–24, 1991. Springer US, Boston, MA, pp. 672–690. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2812-8\\_37](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2812-8_37)
- Visser, A., Beeksmma, I., van der Zee, F., Stams, A.J.M., Lettinga, G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 40, 549–556. <https://doi.org/10.1007/BF00175747>
- Wang, J., Yang, D., Zhang, Y., Shen, J., van der Gast, C., Hahn, M.W., Wu, Q. (2011). Do patterns of bacterial diversity along salinity gradients differ from those observed for macroorganisms? *PLoS One* 6, e27597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027597>
- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N.F.-Y., Zhou, H.-W. (2012). Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater, Intertidal Wetland, and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. *Appl Environ Microbiol* 78, 8264–8271. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12>
- Warwick, R., Clarke, K. (2001). Practical measures of marine biodiversity based on relatedness of species. *Oceanogr Mar Biol: Ann Rev* 39, 207–231.
- Welsh, D.T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* 24, 263–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>
- Welte, C., Deppenmeier, U., 2014. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochim Biophys Acta* (1837), 1130–1147. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.002>
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, Use R!* Springer-Verlag, New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>

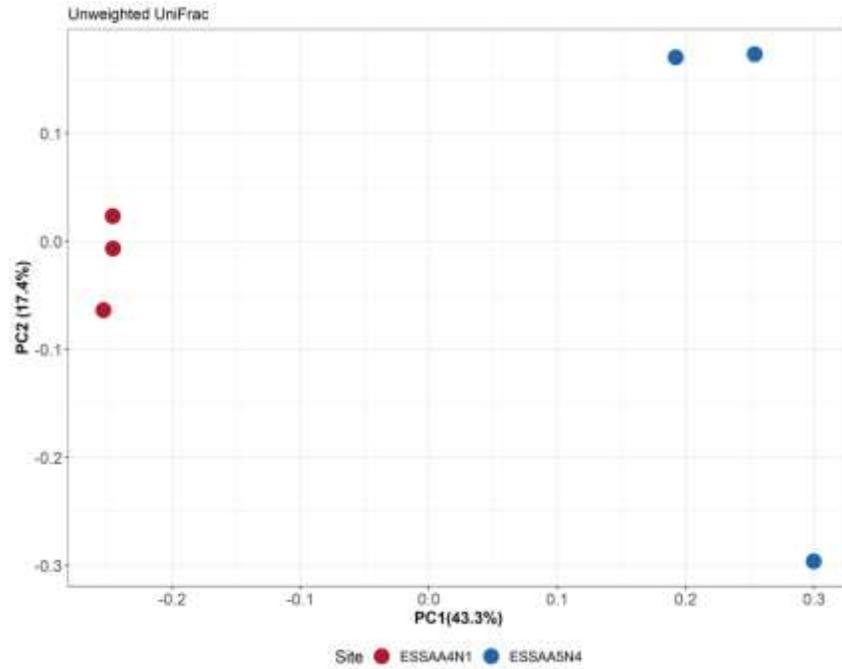
- Wilkins, D., Lu, X.-Y., Shen, Z., Chen, J., Lee, P.K.H. (2015). Pyrosequencing of *mcrA* and archaeal 16S rRNA genes reveals diversity and substrate preferences of methanogen communities in anaerobic digesters. *Appl Environ Microbiol* 81, 604–613. <https://doi.org/10.1128/AEM.02566-14>
- Wong, H.L., Smith, D.-L., Visscher, P.T., Burns, B.P. (2015). Niche differentiation of bacterial communities at a millimeter scale in Shark Bay microbial mats. *Sci Rep* 5, 15607. <https://doi.org/10.1038/srep15607>
- Xiang, X., Wang, R., Wang, H., Gong, L., Man, B., Xu, Y. (2017). Distribution of *Bathyarchaeota* communities across different terrestrial settings and their potential ecological functions. *Sci Rep* 7, 45028. <https://doi.org/10.1038/srep45028>
- Yachi, S., Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *PNAS* 96, 1463–1468. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>
- Yavitt, J.B., Yashiro, E., Cadillo-Quiroz, H., Zinder, S.H. (2012). Methanogen diversity and community composition in peatlands of the central to northern Appalachian Mountain region, North America. *Biogeochem* 109, 117–131. <https://doi.org/10.1007/s10533-011-9644-5>
- Young, I.M., Crawford, J.W., Nunan, N., Otten, W., Spiers, A. (2008). Chapter 4: Microbial distribution in soils: Physics and scaling. In: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 81–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00604-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00604-4)
- Zhang, C.-J., Pan, J., Liu, Y., Duan, C.-H., Li, M. (2020). Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments. *Microbiome* 8, 94. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00876-z>
- Zhou Z, Chen J, Cao H, Han P, Gu JD. (2014). Analysis of methane-producing and metabolizing archaeal and bacterial communities in sediments of the northern South China Sea and coastal Mai Po Nature Reserve revealed by PCR amplification of *mcrA* and *pmoA* genes. *Front Microbiol* 5, 789–789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00789>
- Zhou, Z., Pan, J., Wang, F., Gu, J.-D., Li, M. (2018). Bathyarchaeota: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments. *FEMS Microbiol Rev* 42, 639–655. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy023>
- Zou, D., Liu, H., Li, M. (2020). Community, Distribution, and Ecological Roles of Estuarine Archaea. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02060>

## 11. ANEXOS

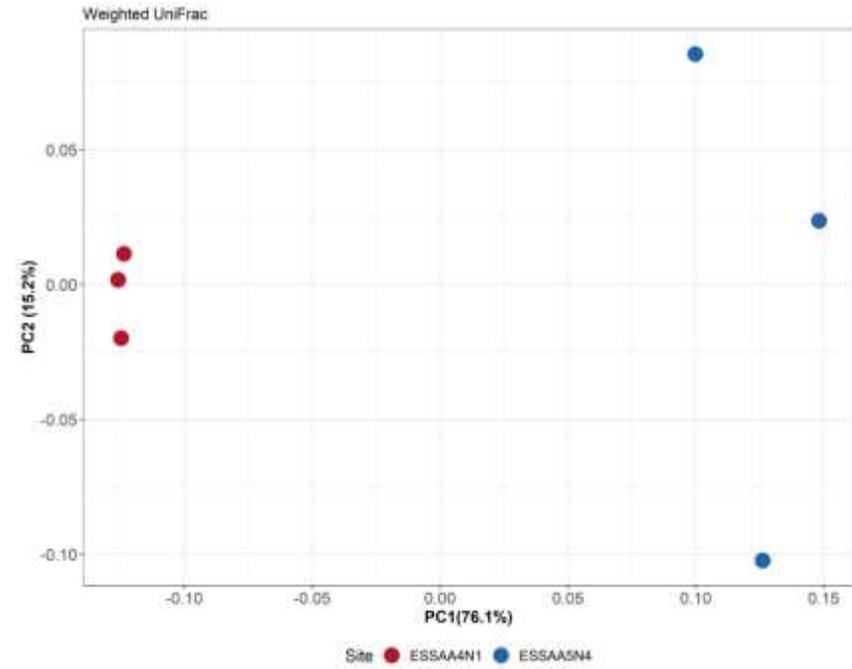


**Figura A.** Índice alfa de rarefacción. Gráfico de número de especies observadas en cada sitio de muestreo. Se observa que ambas curvas están cercanas a la asíntota, lo que sugiere que la profundidad de secuenciación fue buena.

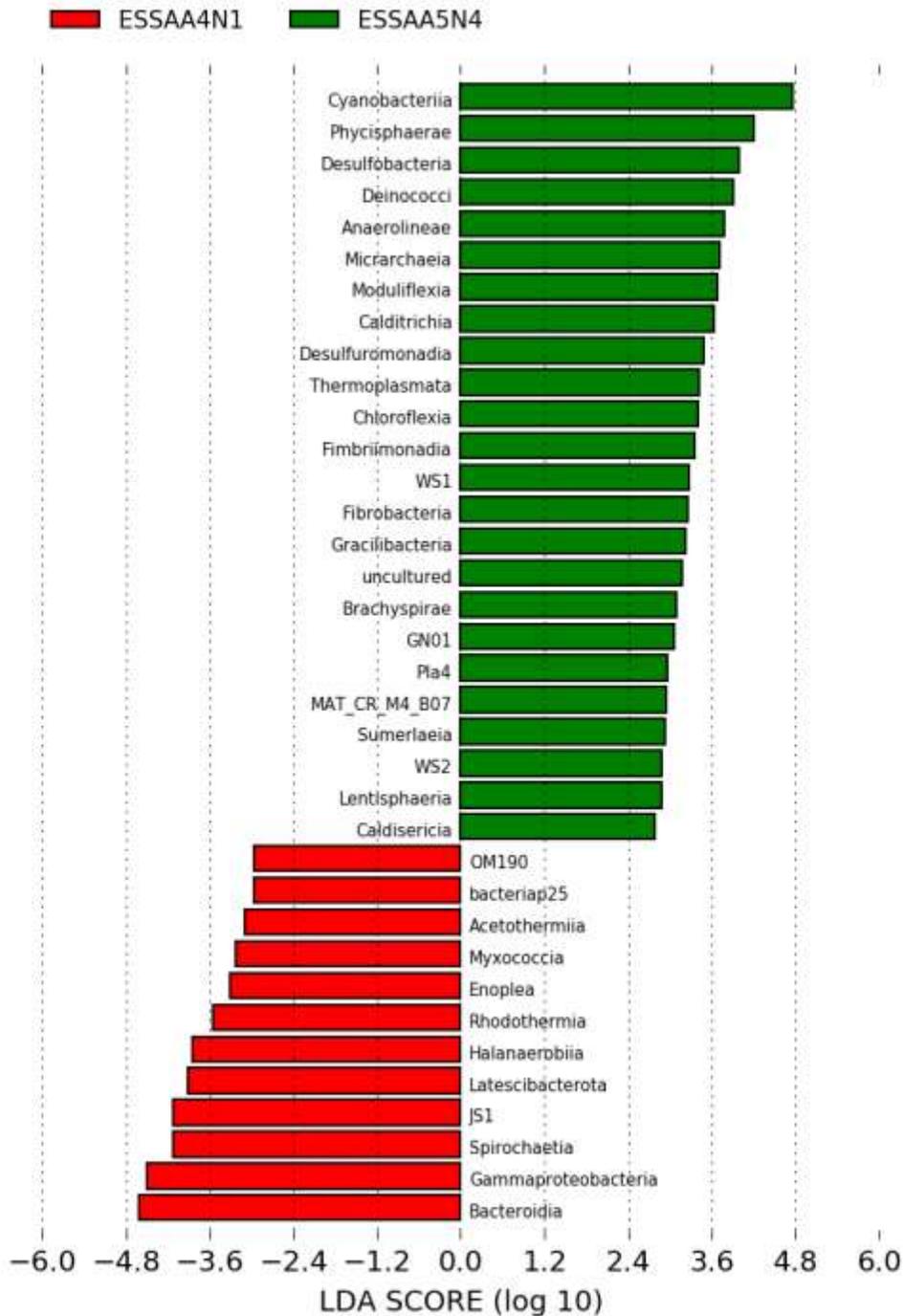
1



2



**Figura B.** PCoA basado en la métrica UniFrac no ponderada (izquierda) y ponderada (derecha) de la diversidad microbiana de ESSAA4N1 (color rojo) y ESSAA5N4 (color azul) de la empresa salinera Exportadora de Sal S.A., utilizando secuencias del gen codificante para la subunidad 16S ARNr.



**Figura C.** Análisis discriminante lineal (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) para identificar ASVs a nivel de Clase que resultaron diferencialmente abundantes entre las muestras de tapete microbiano de los sitios ESSAA4N1 y ESSAA5N4 de la empresa Exportadora de Sal S.A, en Guerrero Negro B.C.S.

**Tabla A.** Abundancias relativas por réplica de los grupos microbianos detectados en ESSAA4N1 y ESSAA5N4 a nivel taxonómico de phylum. Señalados con fondo amarillo se indican los phyla correspondientes al dominio Eukarya, en azul los phyla correspondientes al dominio Arquea y sin color de fondo, aquellos pertenecientes al dominio Bacteria.

Taxon	Sitio					
	ESSAA4N1			ESSAA5N4		
	A	B	C	A	B	C
1 Cyanobacteria	0.8390795	0.62096374	0.815715	9.44002571	14.2017904	13.871243
2 Bacteroidota	42.2115145	45.1564829	48.6598968	29.5332209	39.7519582	36.4843083
3 Desulfobacterota	2.87447038	5.53899652	4.91093724	8.75713023	6.00522193	5.59400777
4 Deinococcota	1.97723685	1.16741182	1.2984851	2.17723146	4.01902275	3.52706931
5 Spirochaetota	10.7834178	10.5812221	10.7624438	9.31148068	6.63931369	8.54271357
6 Proteobacteria	19.0828279	15.9960258	16.2643582	7.75287218	12.150317	7.95486868
7 Verrucomicrobiota	2.86616267	1.90428879	2.39720326	2.51466217	2.66691533	3.58395752
8 Caldatribacteriota	3.55570325	2.97234641	2.0392875	0.46597574	0.27974636	0.14222054
9 <b>Micrarchaeota</b>	0	0	0	1.6951876	0.26109661	1.09983882
10 Halanaerobiaeota	1.66985129	1.3578407	1.04877643	0.08837471	0	0
11 Chloroflexi	2.62523885	2.69084285	1.88113867	4.95701776	3.02126072	4.00113776
12 Latescibacterota	2.40093046	2.47557543	2.55535209	1.0845987	0.72734054	0.3982175
13 <b>Thermoplasmatota</b>	0.26584697	0.33118066	0.13317796	0.77127019	1.04438642	0.37925476
14 Synergistota	0.48184764	0.62924325	0	0	0	0
15 Planctomycetota	2.22646839	2.49213446	2.1142001	7.91355347	3.97239836	5.41386176
16 Calditrichota	0.15784664	0.33946018	0.13317796	1.60681289	0.4382693	1.22309662
17 <b>Nematozoa</b>	0.61477112	0.16559033	0.26635592	0.02410219	0	0
18 <b>Nanoarchaeota</b>	1.49538922	1.46547442	1.49825204	2.56286655	1.24020888	3.14781454
19 Armatimonadota	0	0	0	0.52221419	0.11189855	0.32236655
20 Fermentibacterota	0.73107917	0.87762875	0.38288663	0.57845264	0.24244685	0.11377643
21 Modulibacteria	0	0.0496771	0	1.53450631	0.47556882	0.7679909
22 Zixibacteria	0.1412312	0.24838549	0.19144332	0.44187354	0.27042148	0.1232578
23 Cloacimonadota	0.34061643	0.23182646	0.09155985	0.3615329	0.20514733	0.17066464
24 GN01	0	0	0	0.37760103	0.06527415	0.11377643
25 Marinimicrobia	0	0	0.10820709	0.16068129	0.12122342	0.09481369
26 Patescibacteria	0.29077013	0.18214936	0.21641418	1.09263276	0.31704588	0.50251256
27 Fibrobacterota	0.01661544	0	0.01664724	0.52221419	0.14919806	0.38873613
28 <b>Asgardarchaeota</b>	0.24923154	0.25666501	0.09155985	0.10444284	0	0.03792548
29 Firmicutes	0.2326161	0.20698791	0.09155985	0.49007793	0.11189855	0.35081066
30 Bdellovibrionota	0.31569328	0.22354694	0.50774097	0.49811199	0.47556882	0.25599697
31 WS2	0	0	0	0.2249538	0.02797464	0.07585095
32 Acidobacteriota	0.22430838	0.36429872	0.16647245	0.45794167	0.03729952	0.1232578
33 Myxococcota	0.39046274	0.72031793	0.58265357	0.28119226	0.10257367	0.31288518

**Continuación****Tabla A.** Abundancias relativas por réplica de los grupos microbianos detectados en ESSAA4N1 y ESSAA5N4 a nivel taxonómico de phylum. Señalados con fondo amarillo se indican los phyla correspondientes al dominio Eukarya, en azul los phyla correspondientes al dominio Arquea y sin color de fondo, aquellos pertenecientes al dominio Bacteria.

34	Hydrogenedentes	0.29907784	0.18214936	0.24138505	0.36956696	0.29839612	0.05688821
35	Gemmatimonadota	0.0913849	0.10763371	0.13317796	0.17674942	0.12122342	0.08533232
36	Caldisericota	0	0	0	0.1365791	0.01864976	0.07585095
37	LCP-89	0.04984631	0.03311807	0.13317796	0.04017032	0.1305483	0
38	CK-2C2-2	0	0	0	0.14461316	0	0.13273917
39	Acetothermia	0.06646174	0.15731081	0.04161811	0.03213626	0	0
40	Sumerlaeota	0.05815403	0.08279516	0.09155985	0.18478348	0.11189855	0.30340381
41	MAT-CR-M4-B07	0.04153859	0.03311807	0	0.12854503	0.05594927	0.07585095
42	MBNT15	0	0	0.02497087	0.08837471	0	0
43	Sva0485	0	0	0	0.12051097	0	0
44	Crenarchaeota	0.06646174	0.05795662	0.03329449	0.04017032	0	0.01896274
45	Platyhelminthes	0.06646174	0	0	0	0	0.02844411
46	Euryarchaeota	0.08307718	0.05795662	0	0.06427252	0.04662439	0
47	SAR324	0.01661544	0	0.04994173	0	0	0
48	Margulisbacteria	0	0.02483855	0	0.04017032	0	0
49	PAUC34f	0.01661544	0	0	0	0.04662439	0
50	Iainarchaeota	0	0	0	0	0	0.04740685
51	NB1-j	0.04984631	0	0	0	0	0
52	Dinoflagellata	0	0	0	0.03213626	0	0
53	WS1	0	0	0	0.03213626	0.01864976	0.02844411
54	Dependentiae	0	0	0.02497087	0	0	0
55	Actinobacteriota	0	0	0	0.06427252	0	0.02844411
56	Halobacterota	0.01661544	0	0	0	0	0
57	NKB15	0.01661544	0	0	0	0	0
58	Arthropoda	0	0.01655903	0	0	0	0
59	Methylomirabilota	0	0	0	0	0.01864976	0

**Tabla B.** Abundancias relativas por réplica de los grupos de Arquea detectados en ESSAA4N1 y ESSAA5N4 a nivel taxonómico de Orden.

Taxon	Sitio					
	ESSAA4N1			ESSAA5N4		
	A	B	C	A	B	C
Micrarchaeales	0	0	0	31.3521545	9.68858131	23.015873
MarineBenthic_GroupD_and_DHVEG-1	12.2605364	12.7388535	6.72268908	13.3729569	36.6782007	7.53968254
Woeseearchaeales	68.9655172	56.3694268	75.6302521	47.3997028	46.0207612	65.8730159
Lokiarchaeia	11.4942529	8.59872611	4.62184874	1.93164933	0	1.58730159
Euryarchaeota_uncultured*	1.91570881	5.0955414	8.40336134	2.82317979	2.76816609	0
Bathyarchaeia	3.83141762	2.86624204	0.84033613	1.18870728	0	0.99206349
Methanofastidiosales	0.76628352	2.5477707	2.5210084	0.59435364	0.69204152	0
Iainarchaeales	0	0	0	0	0	0.99206349
Odinarchaeia	0	1.91082803	0	0	0	0
Methanosarciniales	0.76628352	2.5477707	1.2605042	0.89153046	2.42214533	0
Thermoplasmatota_uncultured*	0	7.32484076	0	0.44576523	1.73010381	0

**Acotaciones:** \*: Representantes del dominio Arquea que no alcanzaron una anotación taxonómica a nivel de Orden pero que para fines comparativos es importante considerarlos.