



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**BIOEXPLORACIÓN DE RELACIONES METABÓLICAS ENTRE
COMUNIDADES DE BACTERIAS FERMENTADORAS CON
ARQUEAS METANÓGENAS METILOTRÓFICAS DE
AMBIENTES HIPERSALINOS.**

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

Julián Eduardo Camacho Federico

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2024.

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 Agosto del 2024, 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:

"BIOEXPLORACIÓN DE RELACIONES METABÓLICAS ENTRE COMUNIDADES DE BACTERIAS FERMENTADORAS CON ARQUEAS METANÓGENAS METILOTRÓFICAS DE AMBIENTES HIPERSALINOS "

Presentada por el alumno:

Julián Eduardo Camacho Federico

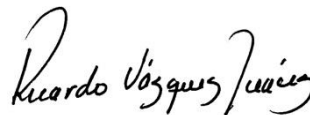
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

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



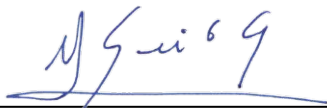
Dr. Alejandro López Cortés
Co-Director de Tesis



Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-Director de Tesis



Dra. Maurilia Rojas Contreras
Co-Tutora de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

CIB Centro de
Investigaciones
Biológicas
del Noroeste

La Paz, Baja California Sur, a 26 de agosto de 2024

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Julián Eduardo Camacho Federico del Programa de Maestría 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
Excluir coincidencias < 12 palabras
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis Posgrado
Se muestra captura de pantalla

Citas excluidas		7%
Bibliografía excluida		SIMILAR
Resumen de Coincidencias		
1	Internet 1054 palabras Copiado el 15-Jun-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx	6%
2	Internet 26 palabras Copiado el 17-Jun-2024 www.elsoldemexico.com.mx	<1%
3	Internet 20 palabras Copiado el 17-Oct-2022 pmcarbono.org	<1%
4	Crossref 17 palabras Ana Victoria Valencia Duarte, Ana Lucía Páez, María Elena Sampedro, Clara Ávila et al. "Evidencia de asociación entr	<1%
5	ProQuest 16 palabras van Vliet, Daan M.. "Exploration of Sulfur-Cycling Microo... anisms from Anoxic Black Sea Waters and Sediment", Wag	<1%
6	Internet 14 palabras Copiado el 20-May-2024 www.coursehero.com	<1%
7	Internet 14 palabras www.nai.arc.nasa.gov	<1%

Firmas del comité

Dr. Alejandro López
Cortés
Co-Director

Dr. Ricardo Vázquez
Juárez
Co-Director

Dra. Maurilia Rojas
Contreras
Co-Tutora

Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

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

Dra. Maurilia Rojas Contreras
Universidad Autónoma de Baja California Sur
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alejandro López Cortés
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Maurilia Rojas Contreras

Jurado de Examen

Dr. Alejandro López Cortés
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Maurilia Rojas Contreras

Suplente

Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada

Resumen

Las vías metabólicas involucradas en la producción de metano están representadas en microorganismos denominados arqueas metanogénicas, las cuales se pueden encontrar en tapetes microbianos hipersalinos. Estos microorganismos presentan diversas rutas metabólicas, siendo la más estudiada, para el ambiente hipersalino, la vía metilotrófica, que emplea compuestos metilados de un carbono. Recientemente, se ha sugerido que las otras vías metabólicas como la metil-reductora, que usa compuestos metilados de un carbono como aceptores de electrones e hidrógeno o formiato como donadores de electrones, también están representadas. Además, se cuenta con evidencia de representantes de la vía metabólica hidrogenotrófica que emplea hidrógeno como donador de electrones y dióxido de carbono como la fuente de carbono y la vía metabólica acetoclástica que emplea acetato. Los tapetes microbianos hipersalinos de Exportadora de Sal, S.A. de C.V., en Guerrero Negro, se caracterizan por ser macroestructuras de biomasa laminada de microorganismos y minerales. Los microorganismos que constituyen este tipo de organosedimento pueden llevar a cabo interacciones tróficas para realizar la transferencia de materia y energía. Se sabe que dependen de bacterias anaerobias obligadas, quienes usan betaína con producción de trimetilamina (TMA), esta última se sabe es un sustrato de alta demanda por arqueas metanogénicas. Debido a que las arqueas metanogénicas se encuentran en muy bajas abundancias relativas (<0.1%), se requiere para su detección de la adición de sustratos orgánicos dirigidos a las bacterias fermentadoras, cuyos productos sean disponibles para el desarrollo de poblaciones de metanógenos. Esto con la finalidad de evaluar si existen relaciones metabólicas constituidas entre bacterias fermentadoras de glucosa o betaína con arqueas metanogénicas. Para dicho estudio se construyeron microcosmos con núcleos de tapetes microbianos, enriquecidos con glucosa o betaína. La producción de metano se estimó mediante cromatografía de gases. La dinámica de poblaciones de bacterias fermentadoras; y arqueas metanogénicas en los microcosmos se determinó a través de secuenciación masiva del gen 16S ARNr. La comunidad microbiana en los tratamientos enriquecidos con glucosa mostró abundancias relativas altas correspondientes a bacterias halófilas anaerobias obligadas del género *Orenia*, capaces de fermentar este sustrato. Mientras que la comunidad microbiana de los tratamientos enriquecidos con betaína presentaron abundancias relativas altas de bacterias halófilas anaerobias obligadas del género *Halanaerobium* capaces de fermentar la betaína a TMA y de arqueas metanogénicas metilotróficas halófilas del género *Methanohalophilus*, que se sabe emplea TMA. Se postula, que la degradación de la materia orgánica en tapetes microbianos que resulta en la producción de metano involucra relaciones metabólicas de cooperación entre bacteria fermentadoras y arqueas metanogénicas.

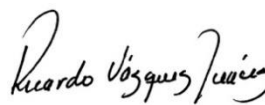
Palabras clave: Arqueas, Bacterias, Metanogénesis, Fermentadoras, Metilotrófica

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3102-7026>

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Alejandro López Cortés



Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Summary

The metabolic pathways involved in methane production are represented in microorganisms called methanogenic archaea, which can be found in hypersaline microbial mats. These microorganisms present several metabolic pathways, the most studied for the hypersaline environment being the methylotrophic pathway, which employs one-carbon methylated compounds. Recently, it has been suggested that other metabolic pathways such as the methyl-reductive pathway, which uses one-carbon methylated compounds as electron acceptors and hydrogen or formate as electron donors, are also represented. In addition, there is evidence of representatives of the hydrogenotrophic metabolic pathway, which uses hydrogen as the electron donor and carbon dioxide as the carbon source, and the acetoclastic metabolic pathway, which uses acetate. The hypersaline microbial mats of Exportadora de Sal, S.A. de C.V., in Guerrero Negro, are characterized by being laminated biomass macrostructures of microorganisms and minerals. The microorganisms that constitute this type of organosediment can carry out trophic interactions to transfer matter and energy. They are known to rely on obligate anaerobic bacteria, which use betaine with production of trimethylamine (TMA), the latter known to be a substrate in high demand by methanogenic archaea. Since methanogenic archaea are found in very low relative abundances (<0.1%), their detection requires the addition of organic substrates directed to the fermenting bacteria, whose products are available for the development of methanogenic populations. This in order to evaluate if there are metabolic relationships between glucose or betaine fermenting bacteria and methanogenic archaea. For this study, microcosms were constructed with microbial mat cores, enriched with glucose or betaine. Methane production was estimated by gas chromatography. The population dynamics of fermenting bacteria and methanogenic archaea in the microcosms was determined by massive sequencing of the 16S rRNA gene. The microbial community in the glucose-enriched treatments showed high relative abundances corresponding to obligate anaerobic halophilic bacteria of the genus *Orenia*, capable of fermenting this substrate. While the microbial community of the betaine-enriched treatments showed high relative abundances of obligate anaerobic halophilic bacteria of the genus *Halanaerobium* capable of fermenting betaine to TMA and of methanogenic methylotrophic halophilic archaea of the genus *Methanohalophilus*, which is known to employ TMA. It is postulated that the degradation of organic matter in microbial mats resulting in methane production involves cooperative metabolic relationships between fermenting bacteria and methanogenic archaea.

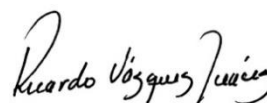
Keywords: Archaea, Bacteria, Methanogenesis, Fermenters, Methylotrophic

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3102-7026>

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Alejandro López Cortés



Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dedicatoria

A mi familia, por ser el pilar fundamental de mi vida.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue desarrollado con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, Beca de Manutención para nivel de maestría 827018; 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”.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y en particular a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por el apoyo proporcionado para mi formación académica.

Agradezco a mi codirector el Dr. Alejandro López Cortés por su apoyo, asesoramiento, consejos, enseñanzas y conversaciones constantes a lo largo de toda la Maestría. Aprecio me diera la oportunidad de desarrollar este tema.

Agradezco a mi codirector el Dr. Ricardo Vázquez Juárez por la confianza, consejos, palabras de ánimo, conocimientos y experiencias brindados en este proyecto.

Agradezco a mi co-tutora la Dra. Maurilia Rojas Contreras por el conocimiento, el apoyo, los consejos y la motivación brindados durante este proceso.

La parte experimental se realizó con el apoyo del Biol. Mar. Hever Latisnere Barragán responsable Técnico del Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología del CIBNOR, a quien le agradezco el apoyo técnico académico otorgado durante el desarrollo de la presente Tesis.

La parte de secuenciación y cromatografía de gases se llevó a cabo en las instalaciones de CINVESTAV en Mérida bajo la supervisión del Dr. José Quinatzin García Maldonado.

El desarrollo del análisis bioinformático se realizó con los consejos de la M. en C. Patricia Jaqueline Ramírez Arenas.

Agradezco el apoyo y asesoramiento académico en el análisis bioinformático al Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.

La culminación de esto es para mis padres Martha Cecilia Federico Contreras y Julian Camacho Parra que fueron los pilares de apoyo que sembraron en mí los principios, valores y determinación para ser la persona que soy y la búsqueda constante de forjar la mejor versión de mí. Por todo el amor y la comprensión que me han mostrado desde el principio. Este logro es suyo.

A mis hermanas María Fernanda Camacho Federico y Karla Sofía Camacho Federico, ustedes que siempre estuvieron en mi camino desde el principio. Que en innumerables ocasiones en el trayecto de nuestra vida nos hemos demostrado amor y apoyo los unos a los otros. Siempre cuentan conmigo.

A mi familia que siempre me han dado su apoyo y motivación para que pueda dar lo mejor de mí. Principalmente a mis abuelos Leticia, Chila, Luis y Moisés que siempre me dieron su cariño y motivación y que han sido uno de los pilares fundamentales en el trayecto de mi vida. A mis tías, tíos, primos y padrinos que me han apoyado toda mi vida. A mi nina Luz que siempre me acompañó en el transcurso de mi vida. Les agradezco con todo mi ser por siempre estar conmigo.

A mi grupo de amigos más cercano que me han acompañado durante estos últimos 12 años, a las amistades cercanas que conseguí a lo largo de la Carrera, a los amigos que obtuve en la Maestría y a todo aquel que he tenido la fortuna de considerar mi amigo en el transcurso de este proyecto.

A esas personas especiales en mi vida que saben que los quiero y que aprecio el apoyo incondicional que me brindan. A ustedes que están conmigo saben que hoy y siempre estaré para apoyarlos.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Abreviaturas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Tapetes microbianos de ambientes hipersalinos.....	3
2.2 Metanogénesis metilotrófica	4
2.3 Metanogénesis hidrogenotrófica	5
2.4 Metanogénesis acetoclástica	6
2.5 Microorganismos fermentadores	6
2.6 Cooperación metabólica	8
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
4.1 Pregunta	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares	13
6. MATERIAL Y METODOS	14
6.1 Diseño del experimento de microcosmos.....	14
6.2 Determinación de las concentraciones de glucosa.....	15
6.3 Determinación de la producción de metano por la técnica de cromatografía de gases.....	16
6.4 Extracción de ácidos nucleicos.....	16
6.5 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
6.6 Preparación de bibliotecas y secuenciación	17
6.7 Análisis bioinformático.....	18
6.7.1 Métricas de diversidad.....	18
7. RESULTADOS	20
7.1 Determinación de Glucosa	20
7.2 Detección de metano mediante cromatografía de gases.....	21
7.3 Análisis bioinformático.....	22
7.3.1 Diversidad y riqueza microbiana.....	22
7.3.2 Análisis de la estructura y composición de la comunidad microbiana en los tratamientos.....	25
7.3.3 Composición de las comunidades de Bacteria y Arquea	27
8. DISCUSIÓN	32
8.1 Enriquecimiento de comunidades bacterianas en experimentos de microcosmos.	34
8.2 Reconstrucción de los procesos de cooperación metabólica dentro del tapete microbiano a partir de grupos detectados.....	41

8.3 Relación entre los análisis de producción de metano y las diferencias en las comunidades microbianas.....	46
9. CONCLUSIONES	48
9.1 Perspectivas.....	48
10. LITERATURA CITADA	50
11. ANEXO	59
Anexo A.-Tabla A. Calendario de recolección de muestras de gas para su posterior análisis en cromatógrafo de gases (GC-FID).....	59
Anexo B.-Figura B. Montaje de frascos con tratamientos control y tratamientos problema con adición de glucosa y betaína de las áreas A4N5 y A5 de la exportadora de sal (ESSA), Guerrero Negro, Baja California Sur.	60
Anexo C.-Figura C. Adición de atmosfera inicial de Nitrógeno (N ₂) a los microcosmos de A4N5 y A5.....	60
Anexo D.-Tabla B. Concentración y pureza de ADN genómico obtenida con el espectrofotómetro NanoDrop.	61
Anexo E.-Figura D. Extracción de ADN de núcleos de Tapete microbiano y Caldo-fase acuosa de cultivo de experimento de microcosmos de A4N5 y A5 de las réplicas “A”, “B” y “C”. Ejemplo: C-A: control A; G-A: glucosa A.....	62
Anexo F.-Secuenciación de amplicones que codifica para 16S ARNr	62
Anexo G.-Figura E. Ensayo preliminar de amplificación de las 9 regiones hipervariables del gen 16S ARNr de A4N5 y A5 de las réplicas “A”, “B” y “C” utilizando los primers 8F-1492R.....	63
Anexo H.-Figura F. Ensayo preliminar de amplificación de las regiones hipervariables V4-V6 del gen 16S ARNr de las áreas A4N5 y A5 de las réplicas “A”, “B” y “C” utilizando los primers 515F-926R.....	64
Anexo I.-Tabla C. Cuantificación de amplicones del gen 16S ARNr en Nanodrop utilizando los primers 515F - 926R con adaptadores para secuenciación en equipo Miseq.	65
Anexo J.-Figura G. Amplificación final de la región hipervariable V4-V6 del gen 16S de las áreas A4N5 y A5 utilizando los primers con sus respectivos adaptadores para su secuenciación en equipo Miseq 515F-926R.	66
Anexo K.-Figura A. Curvas de alfa rarefacción de todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5. Se observa que las curvas están muy cercanas a la asíntota, lo que nos permite inferir que la profundidad de la secuenciación fue optima.	67
Anexo L.-Figura B. Heatmap de la abundancia relativa de Bacteria y Arquea hasta nivel género de los taxas más representativos de las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.	68
Anexo M.-Figura C. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel Clase en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agruparon en “Abundancia <0.1%”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.	69
Anexo N.-Figura D. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel Orden en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de	

A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agruparon en "Abundancia <0.1%". Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas "a", "b" y "c".	70
Anexo O.-Figura E. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel Familia en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agruparon en "Abundancia <0.1%". Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas "a", "b" y "c".	71

Lista de figuras

Figura 1. Vía reductora de acetil-CoA o Wood-Ljungdahl (WLP).....	5
Figura 2. Montaje de experimentos de microcosmos utilizando muestras de núcleo de las áreas A4N5 y A5 de la exportadora de sal (ESSA), Guerrero Negro, Baja California Sur.	15
Figura 3. Determinación de glucosa de Área 4 cerca de 5 (A4N5) y Área 5 (A5).	21
Figura 4. Índices de alfa diversidad de Chao1, Shannon-Weaver (H) y Simpson (D) aplicado a las comunidades microbianas de los tratamientos control y tratamientos enriquecidos con sustratos fermentables (glucosa o betaína) de A4N5 y A5 de izquierda a derecha de cada índice respectivamente.....	25
Figura 5. Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) basado en la métrica de disimilitud de Bray-Curtis, utilizando amplicones de secuencias del que gen que codifican para la subunidad 16S ARNr pertenecientes a las incubaciones por triplicado de los tratamientos control (azul) y a los tratamientos enriquecidos con glucosa (amarillo) o betaína (rosa) de A4N5 y A5. Los valores de estrés <0.1 significan una representación muy confiable de los datos en una gráfica de dos dimensiones.	26
Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la métrica de disimilitud de Bray-Curtis, utilizando amplicones de secuencias del que gen que codifican para la subunidad 16S ARNr pertenecientes a las incubaciones por triplicado de los tratamientos control (azul) y a los tratamientos enriquecidos con glucosa (amarillo) o betaína (rosa) de A4N5 y A5.....	27
Figura 7. Abundancia relativa a nivel Clase de los 10 principales taxa de Bacteria de los tratamientos control y enriquecidos con sustratos de betaína o glucosa de los sitios A4N5 y A5. Los taxa que representan una abundancia menor se agruparon en “Resto”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 de las réplicas “a”, “b” y “c”.....	29
Figura 8. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel género en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agruparon en “Abundancia <0.1%”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.	31
Figura 9. Representación esquemática teórica de la cooperación metabólica entre bacteria fermentadora (<i>Halanaerobium</i>) y arquea metanogénica (<i>Methanohalophilus</i>) para la conversión de betaína a metano (CH ₄) dentro de un núcleo de tapete microbiano de Exportadora de Sal en experimento de microcosmo enriquecido con sustrato de betaína. La betaína es transportada por el gen <i>Opu</i> al interior de los microorganismos y utilizada generalmente como un osmoprotector o reducida a trimetilamina (TMA), y acetyl-CoA mediante el complejo betaína reductasa representado por el gen <i>GrdHI</i> . La TMA es transportada de la bacteria fermentadora del género <i>Halanaerobium</i> (célula azul) a la arquea metanogénica del género <i>Methanohalophilus</i> (célula naranja) mediante la vía transportadora de TMA representada con el gen <i>MttP</i> , seguida de la conversión a Dimetilamina (DMA), Monometilamina (MMA) y finalmente metano (CH ₄) a través de la vía metanogénica metilotrófica que emplea <i>Methanohalophilus</i> . La betaína también es desmetilada a dimetilglicina (DMG) y a un grupo metil (-CH ₃). La DMG es utilizada como un crioprotector y el grupo metil un facilitador de la metanogénesis.	45

Lista de tablas

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación del gen 16S ARNr	17
Tabla 2. Cuantificación de metano por cromatografía de gases con detector de ionización de flama.....	22
Tabla 3. Descriptores de alfa diversidad aplicados a la comunidad microbiana presente en las muestras de Tapete (T) y Caldo-fase acuosa (FA) de los tratamientos control y tratamientos enriquecidos con glucosa o betaína de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Lecturas de secuencias, ASVs observados e índices de alfa diversidad (Chao1, Shannon-Weaver y Simpson) con su respectiva desviación estándar.	24

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
H ₂	Hidrógeno molecular
CH ₄	Metano
ESSA	Exportadora de Sal S.A. de C.V.
McrA	Metil-coenzima M reductasa
mcrA	Gen que codifica para la metil-coenzima M reductasa
pH	Potencial de hidrógeno
TMA	Trimetilamina
PERMANOVA	Análisis de varianza multivariante permutacional
QIIME	Quantitative Insight into Microbial Ecology
WLP	Ruta metabólica Wood-Ljungdahl (Wood-Ljungdahl pathway)
MAGs	Genomas Ensamblados a partir de Metagenomas (Metagenome Assembly Genomes)
PCoA	Análisis de coordenadas principales
A4N5	Área 4 cerca de área 5
A5	Área 5
O ₂	Oxígeno Molecular
<i>Opu</i>	Vía transportadora de betaína y dimetilglicina
<i>GrdHI</i>	Complejo betaína reductasa
DMA	Dimetilamina
MMA	Monometilamina
<i>Mttp</i>	Vía transportadora de Trimetilamina
ASVs	Variantes de secuencias de amplicones (Amplicon Sequence Variants)
DMG	Dimetilglicina
<i>MtgB</i>	Complejo betaína transferasa
CH ₃	Grupo metil
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
16S ARNr	Gen del ARN ribosomal 16S, utilizado para identificación de bacterias
T	Muestras de tapete microbiano
FA	Muestras de Caldo-Fase acuosa de cultivo
α diversidad	Alfa diversidad, índice de diversidad de una comunidad
β diversidad	Beta diversidad, índice comparativo entre comunidades
VSEARCH	Complemento clasificador de taxonomía
SILVA	Base de datos taxonómica
DADA2	Complemento de generación de ASVs
Naive-Bayes	Algoritmo alineador de secuencias representativas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
POD	Peroxidasa
GOD	Glucosa oxidasa
Na ₂ S·9H ₂ O	Sulfuro de sodio nonahidratado
L-Cysteine HCL· H ₂ O	L- Cysteine hidrociorada monohidratada

1. INTRODUCCIÓN

Las vías metabólicas involucradas en la producción de metano (metanogénesis) están representadas en microorganismos denominados arqueas metanogénicas, las cuales pueden encontrarse en tapetes microbianos hipersalinos. Este proceso bioquímico, ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, encontrándose como dominantes a las arqueas que emplean sustratos metilados como la trimetilamina y el metanol (García-Maldonado et al., 2012).

Sin embargo, se han seguido descubriendo en la actualidad nuevos filotipos y grupos de arqueas metanogénicas que presentan otras rutas metabólicas para llevar a cabo la metanogénesis (García-Maldonado et al., 2023). Secuencias del gen *mcrA* que codifica para la metil coenzima M reductasa involucrada en el último paso enzimático de la producción de metano, han sugerido que las vías metabólicas hidrogenotrófica, metil reductora y acetoclástica también están representadas, pero en muy bajas abundancias relativas. La importancia ecológica de la metanogénesis se establece con la degradación completa de la materia orgánica, no obstante, los sustratos empleados por este tipo de metabolismo, resultan del metabolismo de bacterias fermentadoras que degradan azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. Por lo tanto, es de especial interés el ampliar el conocimiento sobre el intercambio de productos metabólicos entre poblaciones de bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas quienes coexisten con beneficio mutuo (Berghuis et al., 2019; García-Maldonado et al., 2018).

La diversidad de las capacidades fermentativas en bacterias es clasificada con base en el tipo de sustrato que se fermenta y los productos metabólicos que se forman. Existen muy pocas excepciones, pero en todas se genera ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato. Uno de los tipos de fermentación más estudiados es la fermentación de la glucosa y los productos generados por estas bacterias son el hidrógeno, CO₂, acetato, entre otros. Además, las bacterias fermentadoras son de gran relevancia ecológica para la degradación de los restos celulares de microorganismos muertos en ambientes naturales anóxicos (Madigan et al., 2015).

Diversos estudios enfocados en la metanogénesis en ambientes hipersalinos han demostrado que la producción de metano es promovida por sustratos no competitivos como la trimetilamina

(TMA) y el metanol en lo que respecta a las vías metilotróficas. En este tipo de ambientes con altas concentraciones de sulfato se podría esperar una competencia entre las bacterias sulfato reductoras y las arqueas metanogénicas por los sustratos hidrógeno y acetato. Condiciones que presentan una ventaja a favor de los microorganismos sulfato reductores, no obstante, esto no sucede y se ha demostrado que los metanógenos utilizan de manera preferencial sustratos metilados como el TMA (Kelley et al., 2015; García-Maldonado et al., 2018). En este escenario, la metanogénesis ocurrida en los ambientes hipersalinos que se caracterizan por poseer altas concentraciones de sulfatos es usualmente llevada a cabo por metanógenos metilotróficos. Aunque la actividad de reducción de sulfato es favorecida de manera termodinámica sobre la metanogénesis hidrogenotrófica en los ambientes hipersalinos, la metanogénesis ocurre por el uso de sustratos no competitivos como la TMA (Orphan et al., 2008; García-Maldonado et al., 2012; García-Maldonado et al., 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tapetes microbianos de ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos son áreas con salinidades mayores a la presente en el agua de mar (mayor de 3.5%). Este tipo de ambientes alrededor del mundo existen desde el Precámbrico (600 a 3,500 millones de años). Un caso de este tipo de ambiente ocurre en las instalaciones de la empresa salinera ESSA, constituida por 13 estanques de concentración, en donde se concentran los iones representativos del agua de mar a diferentes concentraciones (salmuera) y posteriormente se transfieren a vasos cristalizadores donde se precipita y cosecha el cloruro de sodio (NaCl) (López-Cortés, 1991; López-Cortés et al., 2015).

En este tipo de ambiente extremo ante condiciones hipersalinas, la mayoría de las plantas y animales no pueden desarrollarse, solo se desarrollan de manera adecuada microorganismos, principalmente de los Dominios Bacteria y Arquea, debido a sus estructuras y vías metabólicas que sintetizan moléculas osmoreguladoras como la betaína (Oren, 2002).

En el fondo de los estanques de concentración de ESSA se desarrollan organosedimentos denominados tapetes microbianos estratificados y caracterizados por ser sistemas autosustentables, a escala milimétrica, con una inmensa diversidad filogenética, una intrincada y compleja interacción de poblaciones con diversos metabolismos, que hacen a tales entidades una unidad ecológica. En ellos coexisten microorganismos junto con exopolisacáridos y minerales desarrollando patrones de laminación con diferentes tonalidades en los primeros 5 mm (verdes, naranjas, rojas y negras) que conforman la parte activa del tapete microbiano y en la que cada tonalidad representa una función ecológica. La laminación inferior representa el crecimiento previo en proceso de degradación, apreciable por su tonalidad negra (López-Cortés et al., 2015). Representantes de los Dominios Bacteria y Arquea se caracterizan por ser metabólicamente diversos y utilizan distintos mecanismos para la obtención de energía como son la fotoautotrofia, la litotrofia y quimiorganotrofia. Presentan, además, adaptaciones a la presencia de oxígeno como son los aerobios y los anaerobios. Así mismo, estos microorganismos presentan diversos mecanismos de adaptación a las concentraciones de salinidad presentes en los ambientes hipersalinos como son los halotolerantes y los halófilos, de este último destacando las

Haloarqueas por su requerimiento de concentraciones elevadas de sales para su desarrollo óptimo. Las arqueas metanogénicas se encuentran en baja abundancia dentro de los tapetes microbianos, pero son de gran importancia en la búsqueda de combustibles alternativos como el biogás (metano) (Des-Marais, 2003; López-Cortés et al., 2015; Robertson et al., 2008).

2.2 Metanogénesis metilotrófica

El proceso de degradación completa de la materia orgánica en los tapetes microbianos estratificados se realiza por la actividad concertada de bacterias hidrolíticas de polímeros, bacterias fermentadoras, bacterias sulfato reductoras y arqueas metanogénicas. Las arqueas metanogénicas pueden usar un espectro limitado de sustratos: H_2+CO_2 , acetato y compuestos metilados, sulfuros metilados, y compuestos metilados con dependencia de hidrógeno. La metanogénesis metilotrófica es la ruta metabólica mejor representada en estos ambientes (García-Maldonado et al., 2015; Madigan et al., 2015).

Los experimentos de microcosmos demostraron que la producción de metano solo era promovida por sustratos no competitivos como la trimetilamina y el metanol, sugiriendo que la producción de metano en los tapetes ocurre mediante el proceso de la metilotrofia. En este mismo estudio se determinó mediante el uso de secuencias de aminoácidos de la metil coenzima-M reductasa (*mcrA*), la presencia de metanógenos metilotróficos de la familia *Metanosarcinaceae*, predominando el género *Methanohalophilus*. En menor abundancia, también se presentan microorganismos marinos del género *Methanlobus* y microorganismos ligeramente halófilos del género *Methanococcoides* (García-Maldonado et al., 2012). En otro trabajo se caracterizó la composición comunitaria de arqueas metanogénicas tanto en muestras de tapetes microbianos hipersalinos manipulados y no manipulados, donde se demostró que la comunidad de arqueas en estos tapetes está dominada por metanógenos metilotróficos del género *Methanohalophilus* (García-Maldonado et al., 2015). También se han detectado representantes de arqueas de la clase Halobacteria, además de comunidades metanogénicas de los órdenes Methanobacteriales, Methanosarcinales y Methanococcales. Asimismo, la adición de trimetilamina evidenció un aumento en la abundancia de metilotróficos de Methanosarcinales además de aumentar la abundancia de la clase Thermoplasmata, sugiriendo, por lo tanto, la capacidad de estos de utilizar trimetilamina en este tipo de ambientes hipersalinos (García-Maldonado et al., 2018).

2.3 Metanogénesis hidrogenotrófica

Este tipo de metanogénesis se caracteriza por la reducción de dióxido de carbono (CO_2) a metano (CH_4), utilizando al hidrógeno (H_2) como donador de electrones, además de formiato, etanol, alcoholes secundarios y monóxido de carbono (CO) en menor medida. Existen muchas especies hidrogenotróficas que son autótrofas y que son capaces de asimilar el dióxido de carbono (CO_2) mediante la vía acetil-CoA, conocida también como Wood-Ljungdahl (WLP). Esta vía consiste en la combinación directa de forma no cíclica de dos moléculas de dióxido de carbono (CO_2) para producir acetil-CoA. Esta ruta se divide en dos ramas, siendo la rama metilo que consiste en la reducción consecutiva de dióxido de carbono (CO_2) a un residuo metilo unido a un cofactor, y la rama carbonilo que consiste en la reducción de una molécula de dióxido de carbono (CO_2) a un residuo carbonilo unido a una enzima. Dentro de esta vía, la principal enzima es la CO deshidrogenasa/ acetil-CoA sintasa, la cual cataliza la reducción de dióxido de carbono (CO_2) a monóxido de carbono (CO), así como la posterior síntesis de acetil-CoA a partir de los residuos obtenidos de metilo y carbonilo en cada rama. Es gracias a esta ruta que las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas pueden conservar energía durante la metanogénesis (Liu y Whitman, 2008; Berghuis et al., 2019; Madigan et al., 2015; Ramírez-Arenas, 2021).

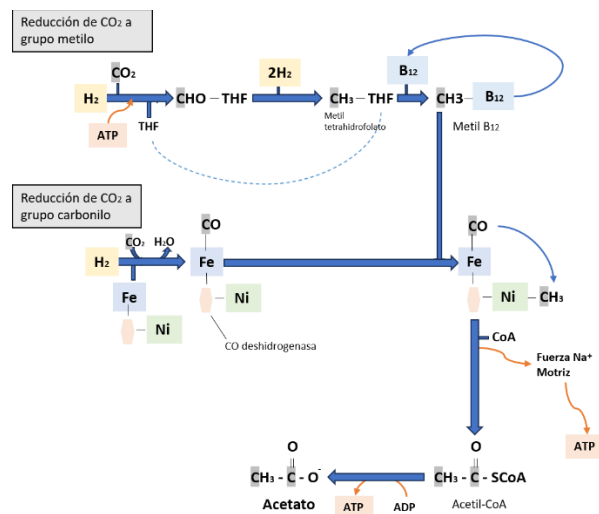


Figura 1. Vía reductora de acetil-CoA o Wood-Ljungdahl (WLP)

Este tipo de metanogénesis se ha determinado en tapetes microbianos hipersalinos mediante análisis filogenéticos de secuencias de *mcrA* con la presencia de nuevos linajes de metanógenos hidrogenotróficos del orden de los Methanomicrobiales. Además, se confirmó la presencia de metanógenos hidrogenotróficos en las pruebas de producción de metano estimulada a condiciones bajas de salinidad y sulfato en experimento de microcosmos (García-Maldonado et al., 2014; 2018).

2.4 Metanogénesis acetoclástica

Esta ruta metanogénica consiste en la división del acetato ($\text{CH}_3\text{-COO}^-$) y en la oxidación del grupo carboxilo a dióxido de carbono (CO_2) mientras que el grupo metilo se reduce a metano (CH_4) en dos reacciones enzimáticas. Estas reacciones ocurren de manera homóloga a los dos pasos finales de la vía hidrogenotrófica Wood-Ljungdahl (WLP). Dentro de esta vía el acetato es degradado directamente por las arqueas metanogénicas cuando el medio posee las condiciones fisicoquímicas óptimas y la presencia de compuestos inhibidores. La degradación del acetato es más común de manera sintrófica debido a que solo los géneros *Methanosaeta* y *Methanothrix* de arqueas metanogénicas son capaces de crecer en acetato. Esta ruta metanogénica es la que presenta menos abundancia de géneros que la realizan (solo dos géneros de *Methanosarcinales*), pero la que más contribuye a la producción de metano (Liu y Whitman, 2008; McGenity y Sorokin, 2019; Ramírez-Arenas, 2021).

2.5 Microorganismos fermentadores

Se han llevado a cabo gran cantidad de trabajos relacionados a las condiciones óptimas de cocultivo de microorganismos fermentadores de azúcares o aminoácidos con metanógenos, los grupos microbianos fermentadores han sido identificados en los tapetes microbianos hipersalinos y se han relacionado con los productos metabólicos que generan al degradar determinados azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. Algunos de estos productos son utilizados por las arqueas metanogénicas por las vías hidrogenotrófica y acetoclástica para la producción de metano (Hattori et al., 2000; Sekiguchi et al., 2003; Ramírez-Arenas, 2021).

Microorganismos fermentadores del phylum Halanaerobiota, especie *Halanaerobium alcaliphilum* crecen óptimamente a una concentración de salinidad de 10%, un intervalo de pH óptimo entre 6.7 a 7.0 y emplean extracto de levadura para llevar a cabo la fermentación de carbohidratos, piruvato y betaína (1%), el resultado de la fermentación de la glucosa, es acetato, butirato, lactato, CO₂ e hidrógeno, mientras que en el caso de la fermentación de betaína genera productos como el acetato y trimetilamina. *Halanaerobium alcaliphilum* al encontrarse en un cocultivo con una cepa metanógena es capaz de degradar la betaína para producir acetato y metano (Tsai et al., 1995), mientras que la especie *Halanaerobium fermentans* al presentarse en condiciones óptimas de salinidad de 10%, temperatura de 35 °C y pH óptimo de 7.5 es capaz de fermentar varios grupos de azúcares como fructosa, galactosa, D-glucosa, lactosa, maltosa, D-manosa, rafinosa, D-ribosa y sucrosa. *H. fermentans* al fermentar D-glucosa obtiene como productos metabólicos: hidrógeno, CO₂, etanol y ácidos orgánicos como acetato, formiato y lactato (Kobayashi et al., 2000). Otra especie de este phylum, *Halanaerobium hydrogeniformans* es capaz de producir hidrógeno con un crecimiento óptimo a un pH de 11, una concentración de salinidad óptima del 7% y a una temperatura de 33 °C. Esta especie es capaz de utilizar un rango de azúcares de C₅ y C₆ dando como resultado acetato, formiato e hidrógeno como productos metabólicos finales (Brown et al., 2011).

Aminobacterium mobile del phylum Synergistota es una bacteria que a temperatura óptima de 37 °C, pH óptimo de 7.4 y extracto de levadura (0.2%) es capaz de fermentar aminoácidos como serina, glicina, threonina y piruvato. Además, en presencia de un metanógeno es capaz de oxidar alanina, glutamato, leucina, isoleucina, valina y aspartato dando como productos resultantes acetato, isobutirato, 2-metil-butirato y isovelarato (Baena et al., 2000).

Otro phylum relevante dentro de los grupos fermentadores presentes en los tapetes microbianos es Chloroflexi, que como en el caso de *Anaerolinea thermophila*, ha demostrado que a condiciones de pH óptimo de 7.0, temperatura óptima de 55 °C y adición de extracto de levadura (1%) es capaz de fermentar glucosa dando productos metabólicos de acetato e hidrógeno con pequeñas cantidades de lactato, formiato y succinato (Sekiguchi et al., 2003).

El phylum Fermentibacterota entre las que destaca la familia Fermentibacteraceae posee capacidad de fermentar azúcares y producir acetato e hidrógeno como producto metabólico final (Kirkegaard et al., 2016).

2.6 Cooperación metabólica

La simbiosis abarca una gran variedad de relaciones entre grupos de microorganismos como son: el parasitismo, en el cual un grupo se ve beneficiado a expensas de otro, la relación de un microorganismo patógeno que causa enfermedad a su hospedador, la relación de comensalismo donde es beneficiado un grupo sin afectar al otro y el mutualismo en el que los dos grupos se ven beneficiados (Madigan et al., 2015). Dentro de la relación de mutualismo entre microorganismos se considera un proceso de coevolución o socios evolutivos cuando la interacción se ha mantenido a lo largo de una escala temporal de millones de años, generando un cambio fisiológico y evolutivo en conjunto, siendo la profundidad de estos cambios el factor clave que puede ocasionar que la simbiosis se convierta en estricta, lo que significaría que ninguno de los dos microorganismos podría sobrevivir sin la presencia del otro (Madigan et al., 2015).

El mutualismo abarca una gran variedad de asociaciones que son definidas por la cooperación metabólica entre distintos grupos de microorganismos, la cual ha sido bien documentada en distintos tipos de ambientes alrededor del mundo, así como los factores que influyen en este tipo de relaciones (Xu, 2006; Hug et al., 2017). El metabolismo anaerobio está asociado a relaciones de cooperación en procesos de degradación de materia orgánica, es un proceso donde la metanogénesis juega un papel clave como en los tapetes microbianos de ambientes hipersalinos (McInerney et al., 1979; Narihiro et al., 2014).

La complejidad de la comunidad de los tapetes microbianos se ha relacionado con la distribución espacial en los diferentes gradientes fisicoquímicos (Harris et al., 2013; Ley et al., 2006). En la parte profunda del tapete mayor a 1 centímetro se localiza un ambiente anóxico, caracterizado por la ausencia de oxígeno y el incremento de sulfuros, y es donde ocurren distintos tipos de relaciones de cooperación metabólica entre grupos microbianos para llevar a cabo la degradación de la materia orgánica (Des Marais, 2003; Konopka et al., 2009).

Las relaciones entre bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas, son un ejemplo de cooperación metabólica que se ha visto evidenciada por el desarrollo y proliferación de estas tasas específicas y los productos metabólicos que generan de su interacción (Tsai et al., 1995; Baena et al., 2000; Borton et al., 2018; An et al., 2019; Li et al., 2021).

Similar a la cooperación metabólica, la sintrofia es una relación mutualista en la que se genera una asociación entre dos microorganismos que cooperan para llevar a cabo la degradación de un sustrato que ninguno de los dos miembros podría por sí solo, generando un producto que será utilizado por uno de los miembros involucrados. Gran cantidad de relaciones de sintrofia se han registrado a través de representantes de bacterias con metabolismo fermentativo y arqueas metanogénicas en condiciones anaerobias (Narihiro et al., 2014; Nobu et al., 2020). Sin embargo, a diferencia de una cooperación metabólica estándar, los factores clave que definen este tipo de asociación es la transferencia interespecífica de hidrógeno por uno de los miembros de la relación sintrófica y su consumo por el otro, además, la mayoría de los sintrofos crecen de manera extremadamente lenta, posiblemente ante una ausencia de competencia que les permite no acelerar su crecimiento para proliferar y que no son reemplazables en la naturaleza (Dolfing, 2001; Konopka et al., 2009; Hardy et al., 2021). El consumidor del hidrógeno producido puede ser desde bacterias sulfato reductoras, bacterias desnitrificantes, bacterias reductoras de hierro, acetógenos y arqueas metanogénicas (Madigan et al., 2015; Hardy et al., 2021). Dentro de la gama de sustratos utilizados en este tipo de relación sintrófica que permite la producción de hidrógeno, están los azúcares, la glucosa es uno de los más ampliamente utilizados por las bacterias fermentadoras, que al encontrarse en cocultivo con un consumidor de hidrógeno, estos son capaces de aprovechar de manera más eficiente este tipo de sustratos (Tsai et al., 1995; Katayama et al., 2020).

Algunos casos registrados de microorganismos sintrofos que emplean este sustrato para producir hidrógeno son bacterias fermentadoras anaerobias como *Anaerolinea thermophila* (Sekigushi et al., 2003), *Bellilinea caldifistula* (Yamada et al., 2007), *Longilinea arvoryzae* (Yamada et al., 2007) y *Atribacter laminatus* (Katayama et al., 2020).

Así mismo, otros casos de sintrofia se llevan a cabo mediante bacterias oxidadoras de acetato

Thermacetogenium phaeum (Hattori et al., 2000), oxidadoras de propionato *Pelotomaculum thermopropionicum* (Imachi et al., 2002), oxidadoras de butirato *Syntrophothermus lipocalidus* (Sekigushi et al., 2000). Además de bacterias oxidadoras de alcoholes como fenol, *Syntrophorhabdus aromaticivorans* (Qiu et al., 2008) y etanol *Tepidanaerobacter syntrophicus* (Sekigushi et al., 2006). Dando como resultado en todos los casos, la transferencia de hidrógeno que permite la relación de sintrofía con otro microorganismo que lo empleara como donador de electrones (fuente de energía metabólica).

3. JUSTIFICACIÓN

La empresa salinera ESSA en Guerrero Negro, es considerada la salina comercial más importante del mundo por la calidad y cantidad de sal producida; 8 millones de toneladas/año. En su sistema de estanquerías se presenta un gradiente de salinidad similar a la representada por el agua de mar (35 a 300 UPS), por lo que se considera un laboratorio natural, con adaptaciones microbianas únicas. Esta condición hipersalina favorece el desarrollo casi exclusivo de miembros de los Dominios Bacteria y Arquea. Dentro de este tipo de ambientes se encuentran macroestructuras denominadas tapetes microbianos hipersalinos, las cuales son organosedimentos que resultan de la actividad metabólica de una gran biodiversidad de grupos de microorganismos. Este tipo de macroestructuras se han considerado las contrapartes de tapetes microbianos y estromatolitos fósiles (López-Cortés, 1998; DesMarais, 2003; García-Maldonado et al., 2012).

Actualmente, nuestro interés está enfocado en la metanogénesis, involucrada en la degradación completa de la materia orgánica. En particular, nos interesa conocer los eventos tróficos previos de la metanogénesis, como es la fermentación y su vínculo con la producción de metano. Por lo tanto, contribuir a la generación de conocimiento de frontera en relación a la metanogénesis es la condición inicial y de posibilidad para el análisis de su uso potencial en la industria y el desarrollo de la idea con propósitos biotecnológicos; Technology Readiness Level (TRL) (López-Cortés, 1998; DesMarais, 2003; NASA, 2012).

4. HIPÓTESIS

Se espera que la adición del sustrato glucosa en los experimentos de microcosmos promueva el crecimiento de bacterias fermentadoras que producen hidrógeno, acetato y dióxido de carbono, productos que podrán ser usados como sustratos por las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas las cuales serán detectadas a través de secuencias que codifican para el 16S ARNr.

Se espera que la adición del sustrato betaína en los experimentos de microcosmos, promueva el crecimiento de bacterias fermentadoras con la producción de trimetilamina (TMA), la cual podrá ser usada como sustrato por las arqueas metanogénicas metilotróficas las cuales serán detectadas a través de secuencias que codifican para el 16S ARNr.

4.1 Pregunta

¿Existen ejemplos de relaciones metabólicas constituidas entre bacterias fermentadoras de glucosa o betaína con arqueas metanogénicas?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Bioexplorar a través de la estimulación con sustratos orgánicos el desarrollo de poblaciones de bacterias fermentadoras y de arqueas metanogénicas en tapetes microbianos hipersalinos.

5.2 Objetivos particulares

1. Enriquecer poblaciones de bacterias fermentadoras a través de la adición de glucosa o betaína en experimentos de microcosmos.
2. Detectar a través de la secuenciación del gen que codifica para el 16S ARNr poblaciones de bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas en experimentos de microcosmos.
3. Estimar por la técnica de cromatografía de gases la producción de metano en experimentos de microcosmos enriquecidos con glucosa o betaína.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Diseño del experimento de microcosmos

Se realizaron experimentos de microcosmos en el Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología CIBNOR, para ello, se utilizaron frascos de suero de 60 ml, utilizando núcleos de una muestra de tapete microbiano hipersalino extraído del área 4 cerca de 5 (A4N5) y área 5 cerca de 4 (A5) en 2022 de Exportadora de Sal (ESSA) ubicada en Guerrero Negro. Las muestras empleadas en este estudio provienen de un experimento de microcosmos previo del cual se usaron los núcleos de los tratamientos “Control” que contenían salmuera artificial químicamente formulada a una salinidad del 8% y una concentración de sulfatos al 73 mM, pH 8.1 (García-Maldonado et al., 2015) y sin la adición de sustratos, para la metanogénesis. Estos núcleos fueron divididos en 4 partes para utilizar uno para cada tratamiento por triplicado con 20 ml de salmuera artificial y se incubaron a 28 °C en condiciones anóxicas en la oscuridad. La salmuera artificial que se utilizó fue diseñada específicamente tomando en cuenta la concentración de salinidad de la localidad (8%) de los sitios A4N5 y A5. A los tratamientos problema se les adiciono extracto de levadura (1%), los agentes reductores $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.05%) y L-Cysteine $\text{HCL}\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.05%), un indicador redox (resazurina (0.001%), además del sustrato de glucosa (1%) o betaína (1%) para cada caso. A los tratamientos control se les adiciono lo anteriormente mencionado sin los sustratos orgánicos de glucosa o betaína. Posteriormente los frascos del experimento de microcosmos se les adicionó una atmosfera inicial de N_2 (Fig. 2). La incubación de los frascos tuvo una duración de dos periodos de 42 días en los que se procedió a realizar un muestreo del gas presente en la parte superior del recipiente cada 14 días con la finalidad de cuantificar posteriormente la presencia de metano mediante cromatografía de gases. Al finalizar la primera etapa de 42 días se recolectaron las muestras de los núcleos y 10 ml de Caldo-fase acuosa de cultivo utilizados en cada replica para su posterior identificación molecular, además se procedió a dar un segundo pulso de sustrato orgánico (glucosa o betaína) a los microcosmos al adicionar otros 10 ml de salmuera enriquecida, posteriormente se repitió el procedimiento para la obtención de muestras de gas cada 14 días durante otro periodo de 42 días.

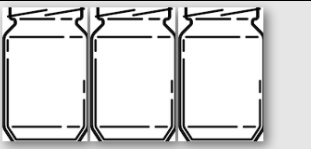
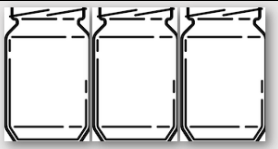
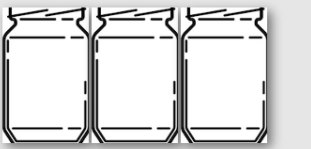
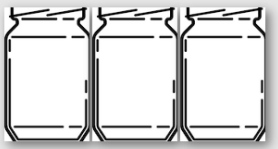
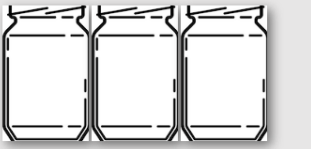
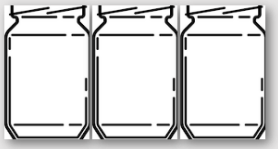
Tratamiento	Sitios (ESSA)	
Control. (Tapete en frasco con atmosfera (N ₂) sin adición de sustrato).	Área 4 (ESSA_A4N5)	Área 5 (ESSA_A5)
		
Problema: Adicionado con glucosa 1% (Tapete en frasco con atmosfera (N ₂) adicionado con glucosa, extracto de levadura).		
Problema: Adicionado con betaína 1% (Tapete en frasco con atmosfera (N ₂) adicionado con betaína y extracto de levadura).		

Figura 2. Montaje de experimentos de microcosmos utilizando muestras de núcleo de las áreas A4N5 y A5 de la exportadora de sal (ESSA), Guerrero Negro, Baja California Sur.

6.2 Determinación de las concentraciones de glucosa

Para el caso de los tratamientos enriquecidos con glucosa de ambos sitios (A4N5 y A5) se procedió a realizar una medición de concentración de glucosa al finalizar la primera etapa (42 días), después de dar el nuevo pulso de sustrato orgánico y al finalizar el experimento de microcosmos después de 84 días de iniciado el experimento (Anexo 1 Tabla A). Para ello, se enviaron muestras de caldo-fase acuosa al laboratorio de Bioquímica fisiológica de CIBNOR. Donde se empleó una determinación colorimétrica de una técnica basada en el principio de la glucosa oxidasa (GOD) como un catalizador en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido en la reacción fue degradado por la peroxidasa (POD) y dio como resultado un producto coloreado de fenol y 4-aminoantipirina. El aumento de la absorbancia de la muestra obtenida es proporcional a la concentración de glucosa presente en cada una de nuestras muestras. Finalmente, se plasmó en un gráfico las concentraciones de glucosa de las tres replicas obtenidas para cada sitio.

6.3 Determinación de la producción de metano por la técnica de cromatografía de gases

La producción de metano se estimó mediante el uso de un cromatógrafo de gases modelo (Agilent-7890A) que posee un detector de ionización de flama de hidrogeno (GC-FID) equipado con una columna (Thermo Scientific-TraceGold) con dimensiones de longitud de 30 m y diámetro interno de 32 mm a una temperatura de 100 °C en el inyector, 100 °C en la estufa y 300 °C en el detector. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a través del equipo. Se inyectó 0.5 ml de todas las muestras de gas en el cromatógrafo (GC-FID) y se utilizaron los estándares de metano (Matheson Tri Gas – Micro Mat 14) con la finalidad de generar una curva estándar para cuantificar las muestras de gas de cada tratamiento de ambas áreas (A4N5 y A5). Se determinó la concentración de metano encontrado en el espacio superior del recipiente de una réplica de cada tratamiento y las muestras de gas fueron obtenidas en muestreos de 14 días durante dos periodos de 42 días.

6.4 Extracción de ácidos nucleicos

Se utilizaron muestras de tapetes microbianos hipersalinos de Área 4 cerca de 5 (A4N5) y Área 5 (A5) para la extracción de ADN genómico, esto para la obtención de un control de la comunidad microbiana existente sin enriquecimiento. Esto se realizó finalizada la primera etapa del experimento de microcosmos que abarco 42 días, se realizó la extracción de ADN genómico de los tratamientos control y los tratamientos enriquecidos con glucosa o betaína de las áreas (A4N5) y (A5) para confirmar la presencia de grupos fermentadores de azúcares y aminoácidos, además de la presencia de arqueas metanogénicas metilotróficas, hidrogenotróficas o acetoclásticas. En ambos casos la extracción de ADN genómico se hizo por triplicado para cada tratamiento y el control a partir de un intervalo de 0.15 a 0.20 g de los núcleos de tapete, también se tomaron 10 mililitros de medio de cultivo de los tratamientos enriquecidos con la finalidad de obtener un pellet celular, la extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante el kit comercial (DNeasy Power Kit (Qiagen) y un batidor de cuentas con un pistilo para generar lisis celular como pretratamiento para los núcleos de tapetes microbianos. Posteriormente, los ácidos nucleicos de cada muestra fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y posteriormente mediante diluciones de 1:5 de cada producto se cuantificó en Nanodrop para determinar su concentración de ácidos nucleicos.

6.5 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se elaboraron productos de PCR a partir del ADN genómico previamente extraído donde se utilizaron los primers con sus respectivos adaptadores para secuenciación en equipo Miseq que amplifican las regiones hipervariables V4-V6 del gen 16S ARNr: 515F (Adaptador 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' Primer 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 926R (Adaptador 5'-GTCCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' Primer 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'). Una vez mezclados los componentes, se llevó a cabo la reacción colocando los tubos que contienen la mezcla en un termociclador (C1000 Touch-Bio Rad) (Tabla 1). Se corrió un programa de 25 ciclos, 95 °C por tres minutos, 95 °C por 45 segundos, 52 °C por 45 segundos, 72 °C por 30 segundos y finalmente para el paso de extensión a 72 °C durante 10 minutos. Finalmente se bajó la temperatura a 12 °C de manera indefinida. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y posteriormente mediante diluciones de 1:10 de cada producto de PCR se cuantificó en Nanodrop para determinar su concentración de ácidos nucleicos.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación del gen 16S ARNr

Componente (Conc. stock)	Concentración final	Volumen por 25 ul de reacción (en μ l)
Go Taq Green Master Mix	1X	12.5
515 forward (10 mM)	1.0 mM	2.5
926 reverse (10 mM)	1.0 mM	2.5
ADN genómico	<250 ng/ μ l	1
H ₂ O bi-destilada libre de DNAsas	N.A.	6.5
	Volumen final	25

6.6 Preparación de bibliotecas y secuenciación

Posteriormente para la elaboración de las bibliotecas se utilizó el protocolo de 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation de Illumina. Las muestras fueron etiquetadas con índices del Kit Nextera XT (Illumina) y se verificó el tamaño promedio de cada biblioteca a través de electroforesis capilar (QIAXEL, Qiagen). Finalmente, las muestras se normalizaron a una concentración de 4nM para secuenciación en equipo Miseq. La secuenciación se realizó en equipo Miseq de Illumina en las instalaciones de CINVESTAV Mérida.

6.7 Análisis bioinformático

Se realizó un análisis bioinformático de la secuenciación masiva realizada para identificar molecularmente los grupos de microorganismos presentes en los tapetes microbianos en el tapete control y los dos tratamientos problema para ambas áreas (A4N5 y A5). Para ello se tomaron las lecturas pareadas obtenidas que presentaron una longitud mínima de 370 pb. Los archivos fastq demultiplexeados se procesaron con el pipeline Quantitative Insight into Microbial Ecology (QIIME2, ver 2023.2). 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”. Las secuencias representativas de ASV se asignaron taxonómicamente con el complemento clasificador de taxonomía VSEARCH con base en regiones superpuestas y empleando como referencia la base de datos SILVA (v. 138). Las secuencias representativas se alinearon con el algoritmo Naive-Bayes. Las tablas de abundancia se exportaron al entorno R, y el análisis estadístico y la visualización se realizaron con las bibliotecas vegan, phyloseq, ggplot, ggplot2, entre otros.

6.7.1 Métricas de diversidad

Tomando en cuenta que el número de secuencias de cada muestra afecta directamente con la estimación de la diversidad de especies (menos secuencias = menos capacidad de detección) se realizó una curva de rarefacción buscando determinar si la secuenciación realizada tuvo la suficiente profundidad para detectar la mayoría de las especies que constituyen las comunidades de todos los tratamientos.

Los índices de alfa diversidad se calcularon empleando la biblioteca de R phyloseq, incluyendo la estimación de riqueza terminal (CHAO1), el índice de diversidad Shannon-Weaver y el índice de diversidad de Simpson. El proceso de normalización se realizó mediante el método metagenomeSeq v1.32.0.

La estimación de beta diversidad se realizó mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) con la distancia de disimilitud de Bray-Curtis, además se realizó un análisis escalado

multidimensional no métrico (NMDS) con distancias de disimilitud de Bray-Curtis entre las muestras para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos y áreas, en función de la presencia (ausencia de taxones microbianos y la distancia filogenética de los mismos).

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de Glucosa

Los resultados de determinación de glucosa del experimento de microcosmos de las áreas A4N5 y A5 (Fig. 3) mostraron una tendencia de decremento en las concentraciones en las tres réplicas del tratamiento, lo que se puede inferir como un aprovechamiento de la glucosa por parte de los microorganismos dentro de los frascos. Partiendo de una concentración inicial de 7.5 mg/ml se apreció como todos los tratamientos con adición de glucosa, principalmente la réplica "C" para A4N5 y réplica "A" para A5, mostraron un descenso en la primera medición que corresponde al final de la primera etapa del experimento de microcosmos (42 días). Posteriormente se observa un incremento en la concentración en el Tiempo 2 en todas las réplicas debido a la adición de un nuevo pulso de glucosa en los frascos para confirmar el aprovechamiento de este por parte de los microorganismos. Mostrando en el tiempo 3 después de otros 42 días un notorio descenso en todas las réplicas, infiriendo nuevamente el aprovechamiento del sustrato por parte de los microorganismos. Siendo en esta última medición donde la réplica "A" de A5 muestra nuevamente un mayor descenso que las otras dos réplicas de Área 4.

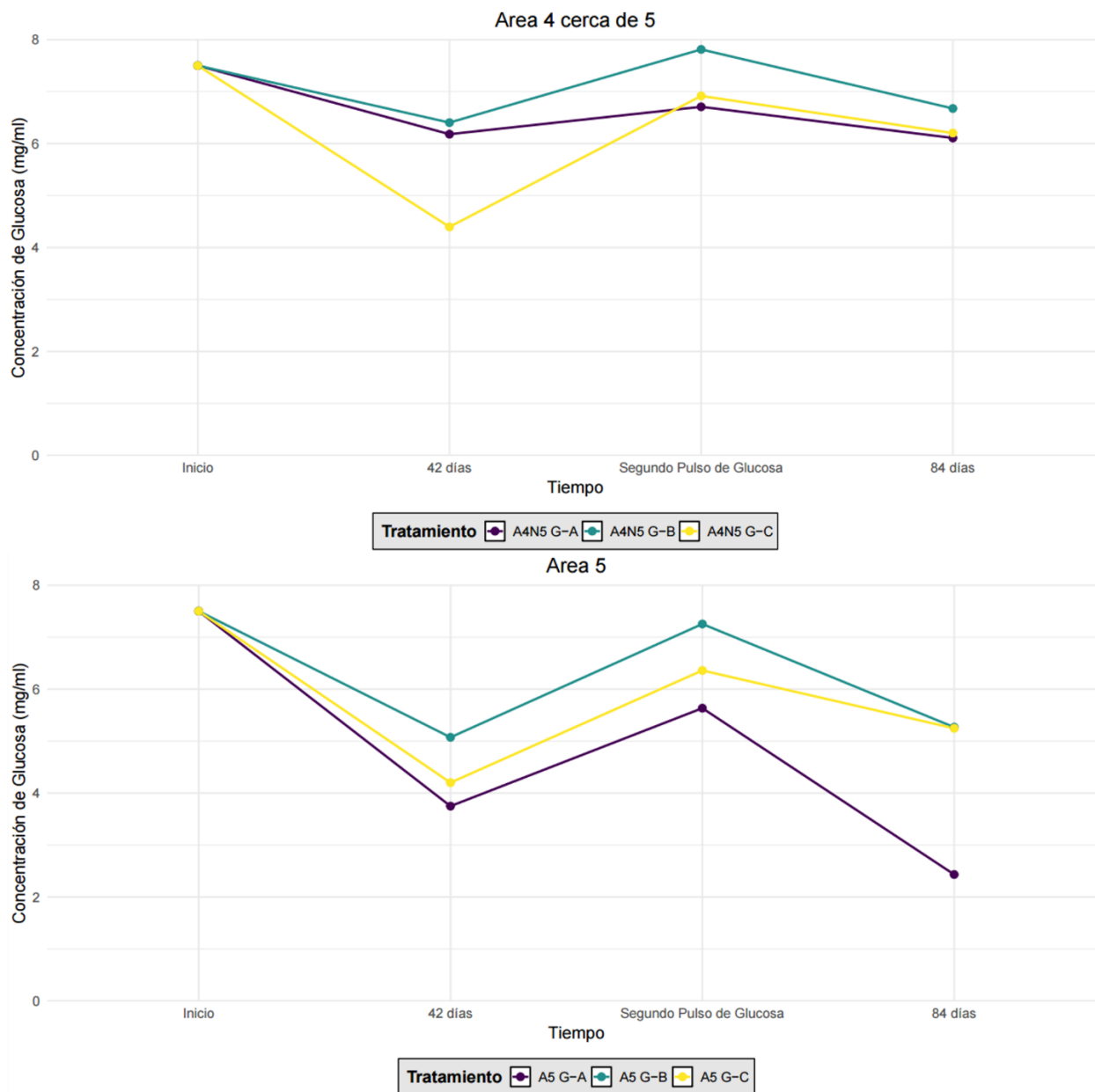


Figura 3. Determinación de glucosa de Área 4 cerca de 5 (A4N5) y Área 5 (A5).

7.2 Detección de metano mediante cromatografía de gases

Los valores de concentración de metano (Tabla 2), fueron inexistentes, excepto para el tratamiento control del sitio A4N5, con un valor de 3.57 mmol a los 28 días. En contraste el tratamiento control del sitio A5, mostró una tendencia de más a menos en las concentraciones de metano en el intervalo de 14 a 84 días. El tratamiento enriquecido con sustrato de betaína mostró concentraciones más elevadas de metano en comparación con el tratamiento control en

ambos sitios (A4N5 y A5) en los dos periodos de 42 días y mostrando un declive en la concentración de metano en la segunda etapa. Estos resultados muestran la efectividad del enriquecimiento con betaína en la estimulación de la producción de metano. En el tratamiento enriquecido con glucosa en el sitio A4N5, no se detectó metano, mientras que en el sitio A5 se detectaron solo dos concentraciones en los primeros dos muestreos que resultaron ser menores que los del tratamiento control, siendo que, en las muestras de gas posteriores, no se evidenció ninguna detección de metano. Lo anterior sugiere una respuesta diferencial a la glucosa entre los sitios. En el caso del tratamiento control y tratamiento enriquecido con betaína, la disminución en la concentración de metano después de los 42 días podría atribuirse a la ausencia del núcleo del tapete microbiano, el cual fue extraído con la finalidad de llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos.

Tabla 2. Cuantificación de metano por cromatografía de gases con detector de ionización de flama.

Sitio	Tratamiento	14 días	28 días	42 días	56 días	70 días	84 días
		(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mmol)
A4N5	Control	0	3.57	0	0	0	0
	Betaína	29.51	9974.40	7483.65	537.34	295.29	719.05
	Glucosa	0	0	0	0	0	0
A5	Control	113.16	115.23	80.29	4.33	4.36	3.03
	Betaína	1450.49	13267.84	6764.3	606.49	670.41	882.46
	Glucosa	37.83	15.59	0	0	0	0

7.3 Análisis bioinformático

7.3.1 Diversidad y riqueza microbiana

Se obtuvieron un total de 474,910 de secuencias crudas de la secuenciación del gen 16S ARNr. Después de la eliminación de ruido y la eliminación de quimeras, se recuperaron 306,301 (64.49%) secuencias de alta calidad. Se detectaron un total de 1822 ASVs en todas las muestras, de las cuales, 1776 pertenecen a bacterias y 46 a arqueas. Para los índices de alfa y beta diversidad se utilizaron aquellos ASVs que alcanzaron una asignación taxonómica a cualquier nivel. Las curvas de alfa rarefacción indicaron que nuestra profundidad de secuenciación fue suficiente para capturar la mayor parte de la diversidad de taxonías en cada muestra (Anexo 2 Fig. A). Las métricas de diversidad que se muestran en la Tabla 3 no revelaron diferencias significativas en la diversidad

microbiana entre A4N5 y A5 (Kruskal-Wallis, $p = 0.88457$); indicando una diversidad y riqueza similar de ASVs en ambos sitios. Sin embargo, se aprecian diferencias significativas en la diversidad microbiana entre los tratamientos enriquecidos con sustratos fermentables (glucosa y betaína) y el control (Kruskal-Wallis, con glucosa ($p = 0.000747$) y betaína ($p = 0.002726$); lo que indica una mayor diversidad de ASV al compararse entre tratamientos como se aprecia en la Tabla 3 y la Fig. 4. Donde se determinó mediante los índices de alfa diversidad de Chao1, Shannon-Weaver y Simpson que los tratamientos que muestran una mayor diversidad son los tratamientos control, seguido de los tratamientos enriquecidos con betaína (muestras de Tapete y Caldo-fase acuosa respectivamente) y finalmente el tratamiento de glucosa (muestras de Tapete (T) y Caldo-fase acuosa (FA) respectivamente). Se aprecia en el tratamiento de glucosa de A4N5 que las muestras de Caldo-fase acuosa mostraron una menor diversidad y riqueza en contraste con las muestras de tapete. Este aspecto es contrario en las muestras de A5, sin embargo, se toma en cuenta la grandiferencia de ASV observados en muestras de Tapete (T) en contraste con muestras de Caldo-fase acuosa (FA)

Tabla 3. Descriptores de alfa diversidad aplicados a la comunidad microbiana presente en las muestras de Tapete (T) y Caldo-fase acuosa (FA) de los tratamientos control y tratamientos enriquecidos con glucosa o betaína de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Lecturas de secuencias, ASVs observados e índices de alfa diversidad (Chao1, Shannon-Weaver y Simpson) con su respectiva desviación estándar.

Sitio	Tratamiento	Lecturas	ASVs observados	Chao1	Shannon-Weaver	Simpson
A4N5	Control	11977.3 ± 694.63	242.6 ± 35.92	242.6 ± 35.92	3.8 ± 0.41	0.94 ± 0.02
	Betaína (T)	10589 ± 1533.52	156.6 ± 7.76	156.6 ± 7.76	3.4 ± 0.32	0.91 ± 0.03
	Betaína (FA)	6071.3 ± 875.35	66.66 ± 19.55	66.66 ± 19.55	2.96 ± 0.28	0.91 ± 0.02
	Glucosa (T)	14083 ± 2057.10	179.3 ± 15.27	179.3 ± 15.27	2.05 ± 0.23	0.62 ± 0.07
	Glucosa (FA)	14470.3 ± 1369.23	17.6 ± 6.50	17.6 ± 6.50	1.17 ± 0.24	0.56 ± 0.10
A5	Control	9427.3 ± 2705.61	281 ± 42.56	281 ± 42.56	3.93 ± 0.06	0.94 ± 0.01
	Betaína (T)	7353 ± 1687.97	163 ± 37.80	163 ± 37.80	3.53 ± 0.15	0.93 ± 0.01
	Betaína (FA)	6884 ± 1189.66	92 ± 19.31	92 ± 19.31	2.88 ± 0.30	0.87 ± 0.05
	Glucosa (T)	12723.6 ± 2527.89	105.3 ± 31.78	105.3 ± 31.78	1.60 ± 0.06	0.59 ± 0.01
	Glucosa (FA)	8521 ± 3379.21	21 ± 7.54	21 ± 7.54	1.75 ± 0.04	0.77 ± 0.01

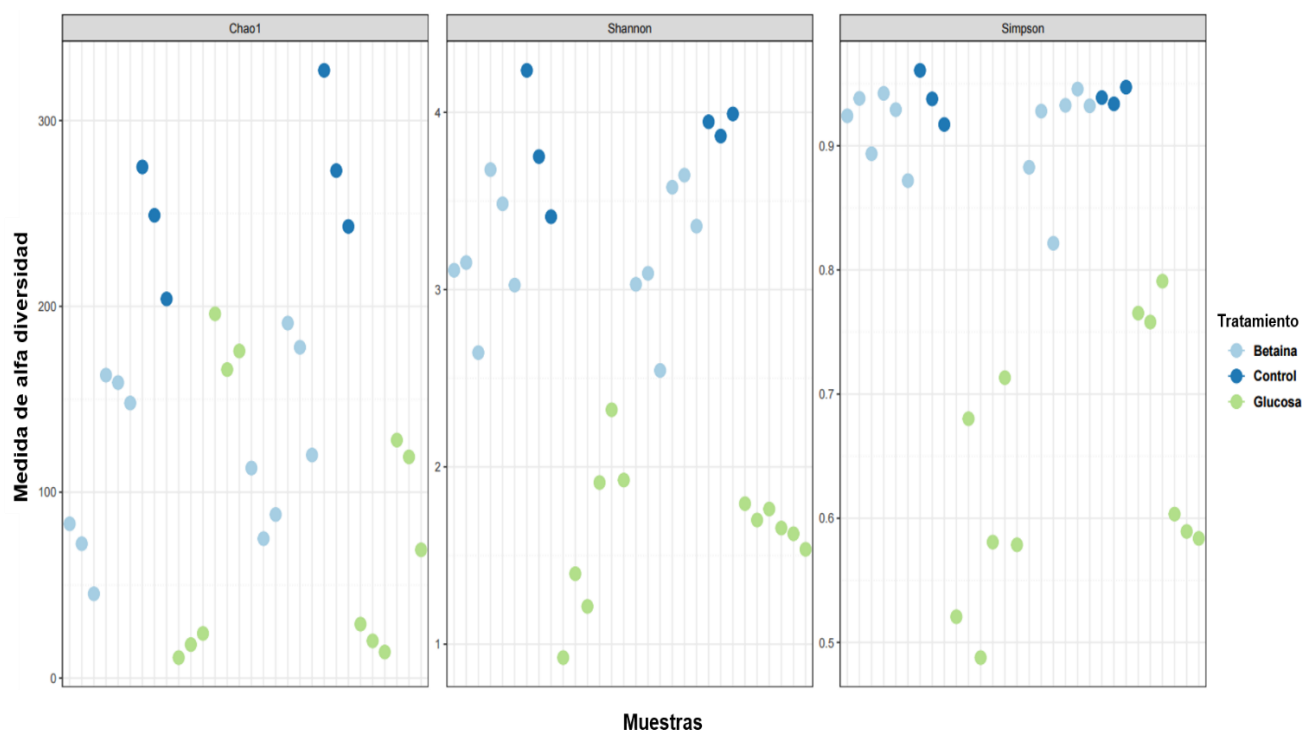


Figura 4. Índices de alfa diversidad de Chao1, Shannon-Weaver (H) y Simpson (D) aplicado a las comunidades microbianas de los tratamientos control y tratamientos enriquecidos con sustratos fermentables (glucosa o betaína) de A4N5 y A5 de izquierda a derecha de cada índice respectivamente.

7.3.2 Análisis de la estructura y composición de la comunidad microbiana en los tratamientos

Con la finalidad de explorar las diferencias en la estructura y composición de la comunidad (β diversidad) entre las muestras de los tratamientos control y tratamientos enriquecidos con glucosa o betaína de las áreas A4N5 y A5 se visualizaron las distancias de disimilitud de Bray-Curtis mediante un gráfico de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). La visualización en dos dimensiones de NMDS fue suficiente para apreciar la dinámica espacial y la variación en los perfiles de la comunidad microbiana de los tratamientos (estrés = 0.0836), el valor de estrés obtenido nos permite determinar que esta visualización de los datos es muy confiable. La distribución de las distancias basadas en el gen que codifica para la subunidad 16S ARNr confirmó que las muestras de los tratamientos enriquecidos con sustratos fermentables como glucosa o betaína de A4N5 y A5 se agruparon con las muestras de los tratamientos control. Se aprecia claramente un patrón claro en el agrupamiento entre las réplicas de cada tratamiento (Fig. 5).

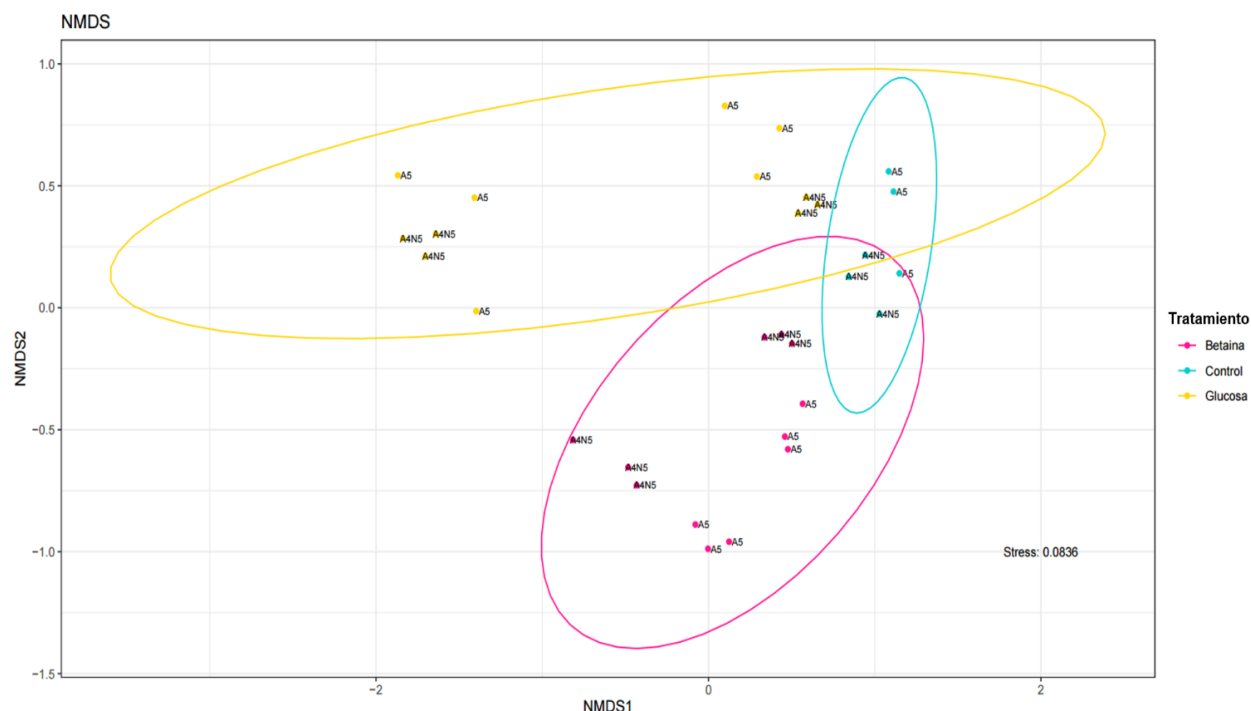


Figura 5. Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) basado en la métrica de disimilitud de Bray-Curtis, utilizando amplicones de secuencias del que gen que codifican para la subunidad 16S ARNr pertenecientes a las incubaciones por triplicado de los tratamientos control (azul) y a los tratamientos enriquecidos con glucosa (amarillo) o betaína (rosa) de A4N5 y A5. Los valores de estrés <0.1 significan una representación muy confiable de los datos en una gráfica de dos dimensiones.

Se visualizaron las distancias de disimilitud de Bray-Curtis mediante otro tipo de gráfico denominado como Análisis de coordenadas principales (PCoA) para comparar las diferencias en la estructura y composición de la comunidad (β diversidad) entre las muestras de los tratamientos control y tratamientos enriquecidos con glucosa o betaína de las áreas A4N5 y A5. La distribución obtenida de las distancias basadas en el gen que codifica para la subunidad 16S ARNr confirmo que las muestras de los tratamientos enriquecidos con betaína en ambas áreas (A4N5 y A5) se agruparon con las muestras de los tratamientos control. Se aprecia claramente un patrón claro en el agrupamiento entre las réplicas del control con el tratamiento de betaína (Fig. 6). Sin embargo, en esta visualización de los datos se aprecia una dinámica espacial significativa entre el tratamiento enriquecido con glucosa al resto de tratamientos.

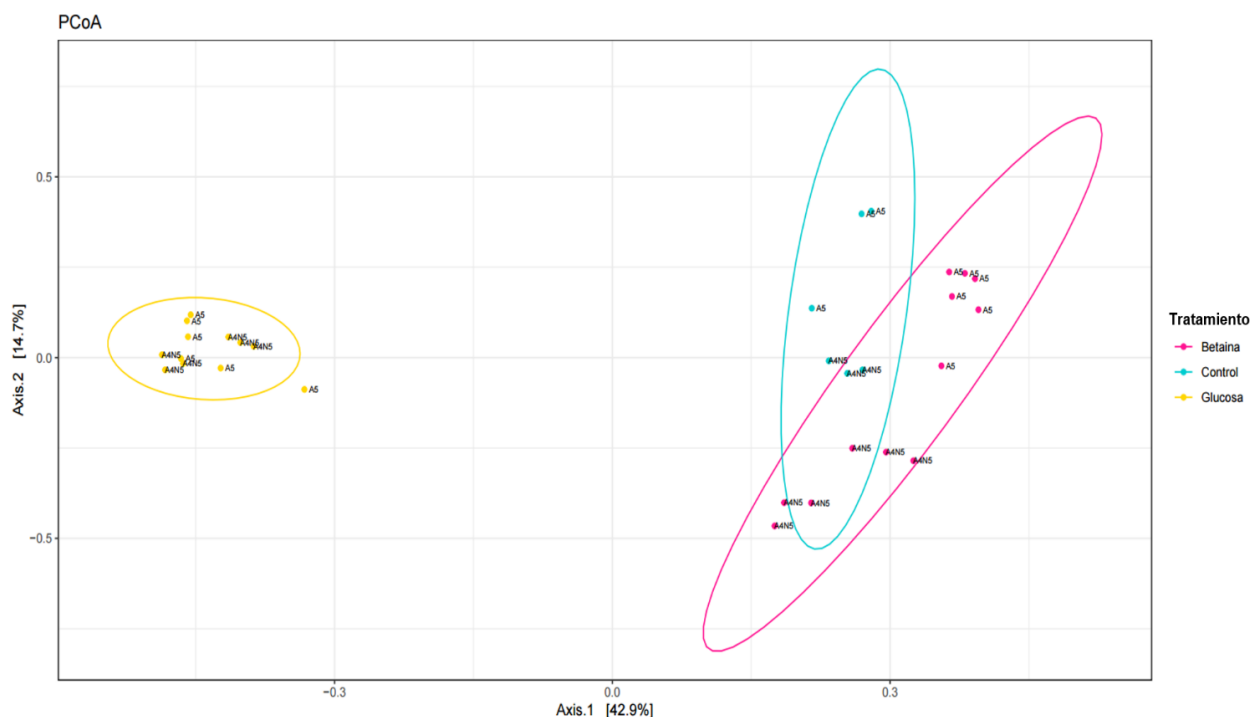


Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la métrica de disimilitud de Bray-Curtis, utilizando amplicones de secuencias del que gen que codifican para la subunidad 16S ARNr pertenecientes a las incubaciones por triplicado de los tratamientos control (azul) y a los tratamientos enriquecidos con glucosa (amarillo) o betaína (rosa) de A4N5 y A5.

7.3.3 Composición de las comunidades de Bacteria y Arquea

En este análisis se observó una mayor abundancia relativa de Bacteria con respecto a miembros de Arquea. Los miembros del dominio Bacteria representaron >97% de las asignaciones de secuencias del gen que codifica para el 16S ARNr en el control y en todos los tratamientos de ambos sitios (A4N5 y A5), mientras que el resto de las secuencias fueron asignadas a Arquea <3%.

El análisis de la composición de la comunidad y estructura del dominio Bacteria (Fig. 7) mostró que los tratamientos control están compuestos principalmente de las Clases Halanaerobiiia (39.07-4.87%), Desulfovibrionia (11-5.59%), Clostridia (2.85-0.64%), Bacteroidia (28.80-3.11%), Spirochaetia (17.70-4.90%), Phycisphaerae (6.29-3.48%), Thermotogae (9.61-3.11%), Desulfobacteria (20.41-1.57%), Synergistia (0.84-0.34%), VadinHA49 (13.26-0.81%) y Gammaproteobacteria (15-0.35%). Mientras que las abundancias relativas de los miembros del dominio Arquea mostró estar compuesto de las Clase Thermoplasmata (1.75-0.09%) (Anexo 2 Fig. C).

Los tratamientos enriquecidos con glucosa promovieron el desarrollo de miembros de las Clases Halanaerobiiia (99.80-78.52%), Desulfovibrionia (2.39-0.12%), Clostridia (7.95-0.59%), Bacteroidia (3.45-0.47%), Spirochaetia (3.72-1%), Phycisphaerae (4.54-0.83%), Thermotogae (2.11-0.35%), Desulfobacteria (1.86-0.24%), Synergistia (0.30-0.13%), VadinHA49 (0.81-0.16%) y Gammaproteobacteria (0.56-0.10%), sin detección de secuencias pertenecientes a arqueas metanogénicas.

Los tratamientos enriquecidos con betaína favorecieron el desarrollo de miembros de la Clase Halanaerobiiia (49.81-15.53%), Desulfovibrionia (41.38-3.68%), Clostridia (50.42-4.76%), Bacteroidia (32.57-1.62%), Spirochaetia (14.32-0.54%), Phycisphaerae (8.07-1.14%), Thermotogae (4.66-0.30%), Desulfobacteria (8.05-0.58%), Synergistia (2.62-0.10%), VadinHA49 (0.81-0.04%) y Gammaproteobacteria (0.43-0.07%). Por otro lado, el dominio Arquea mostró estar compuesto de las Clases Thermoplasmata con valores de abundancia relativa en el intervalo de 1.29 a 0.06% y Methanosarcinia entre 0.70 a 0.05% (Anexo 2 Fig. C).

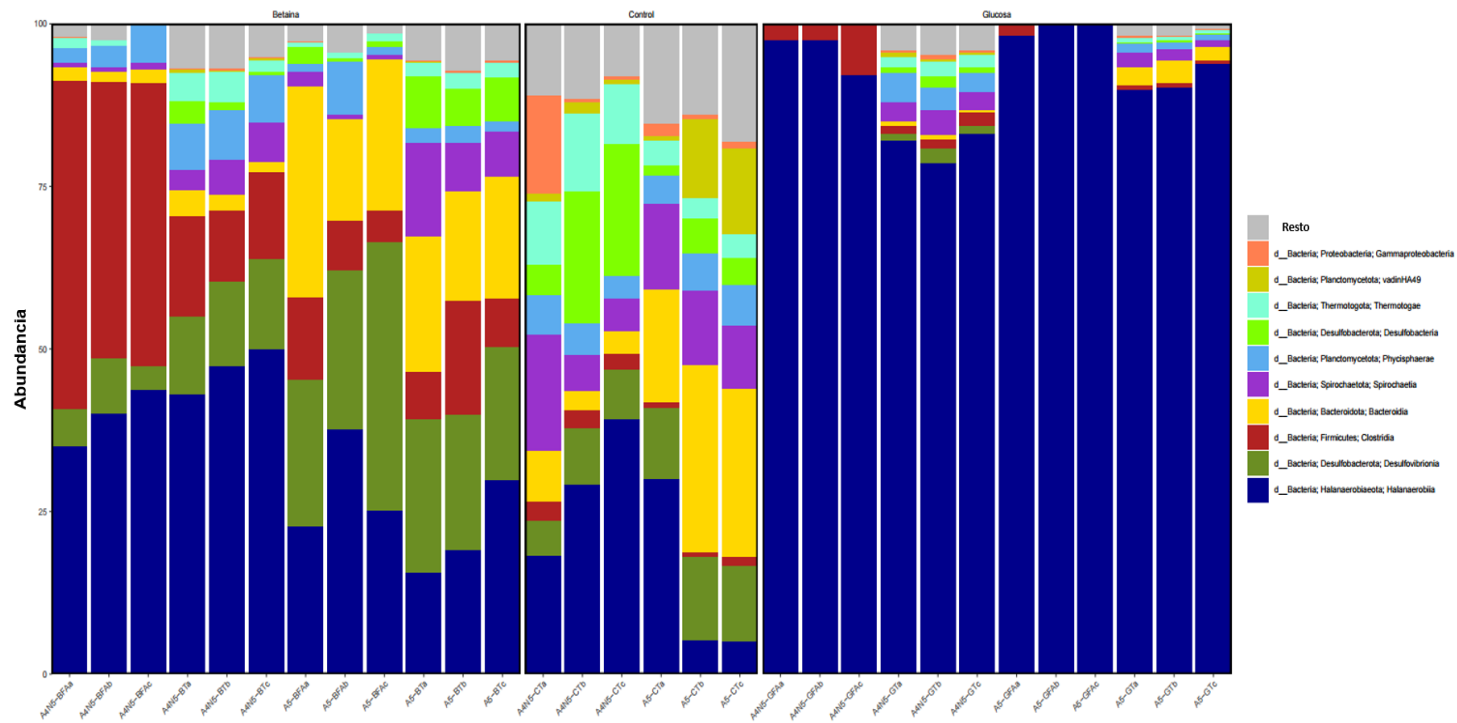


Figura 7. Abundancia relativa a nivel Clase de los 10 principales taxa de Bacteria de los tratamientos control y enriquecidos con sustratos de betaína o glucosa de los sitios A4N5 y A5. Los taxa que representan una abundancia menor se agruparon en “Resto”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 de las réplicas “a”, “b” y “c”.

El análisis de la composición de la comunidad y estructura del dominio Bacteria (Fig. 8 y Anexo 2 Fig. B) mostró que los tratamientos control están compuestos principalmente de los géneros *Orenia* (11.03-0.25%), *Halanaerobium* (35.43-4.61%), *Desulfovermiculus* (7.56-1.76%), SC103 de la familia Petrotogaceae (11.41-3.11%), AKAU3564-sediment-group del Orden Phycisphaerales (4.25-2.01%), *Desulfoplanes* (3.72-0.11%), *Desulfovibrio* (3.20-0.10%), *Tangfeifania* (0.65-0.06%), *Sediminispirochaeta* (7.39-1.82%), *Spirochaeta_2* (3.76-2.29%), *VadinHA49* del phylum Planctomycetota (13.26-0.73%) y por *Clostridiisalibacter* (1.01-0.04%). El género *Desulfobacter* fué solo apreciable en dos réplicas de A4N5 con (15.63-14.18%) y *Marinobacter* en una réplica de cada sitio A4N5 (14.56%) y A5 (0.86%). El dominio Arquea mostró principalmente presencia del género *Marine_Benthic_Group_D_and_DHVEG-1* de la Clase Thermoplasmata con (1.75-0.06%) en todas las réplicas de ambos sitios (A4N5 y A5).

Los tratamientos enriquecidos con glucosa estimularon el desarrollo de bacterias fermentadoras anaerobias obligadas de los géneros *Orenia* (99.80-75.53%), *Halanaerobium* (2.62-0.31%), *Desulfovermiculus* (0.70-0.09%), SC103 de la Familia Petrotogaceae (1.96-0.47%), AKAU3564-sediment-group del Orden Phycisphaerales (3.02-0.52%), *Desulfoplanes* (1.67-0.09%), *Sediminispirochaeta* (1.90-0.73%), *Spirochaeta_2* (0.72-0.23%), *VadinHA49* del phylum Planctomycetota (0.81-0.16%) y *Clostridiisalibacter* (1.08-0.04 %).

Los tratamientos enriquecidos con betaína favorecieron el desarrollo de los géneros *Orenia* (23.88-0.89%), *Halanaerobium* (38.06-12.76%), *Desulfovermiculus* (16.83-0.77%), SC103 de la familia Petrotogaceae (4.61-0.30%), AKAU3564-sediment-group del Orden Phycisphaerales (2.11-0.10%), *Desulfoplanes* (5.01-0.11%), *Desulfovibrio* (5.95-1.66%), *Tangfeifania* (2.24-0.14%), *Sediminispirochaeta* (12.72-0.23%), *Spirochaeta_2* (0.49-0.2%), *VadinHA49* del phylum Planctomycetota (0.81-0.10%), *KCLunmb-38-53* de la Clase Phycisphaerae (7.85-0.25%) y *Clostridiisalibacter* (24.20-1.41%). Mientras que para el dominio Arquea mostro principalmente presencia del género *Marine_Benthic_Group_D_and_DHVEG-1* de la Clase Thermoplasmata con (1.24-0.05%) y el género *Methanohalophilus* de la Familia Methanosarcinaceae con (0.70-0.21%).

Además, es apreciable en Anexo 2 Fig. B del como los taxa dentro de las muestras de Caldo-fase acuosa suelen mostrar una menor diversidad de géneros en contraste con las muestras de tapete. Los grupos a nivel Orden y Familia se aprecian en Anexo 2 Fig. D y E respectivamente.

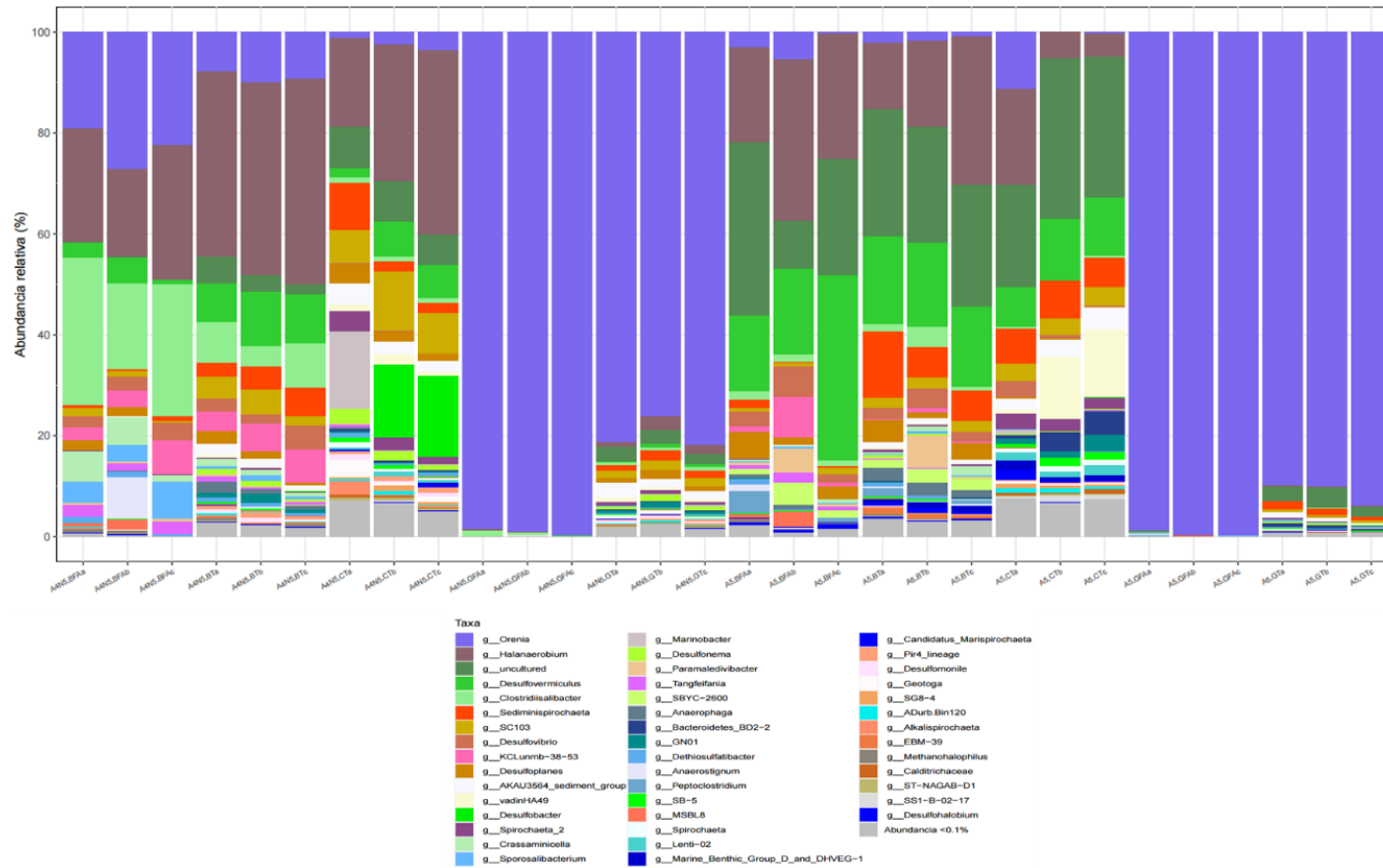


Figura 8. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel género en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agruparon en “Abundancia <0.1%”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis abordan dos de los tres objetivos de la Ecología Microbiana Moderna:

a) la biodiversidad como propiedad emergente, y b) las interacciones entre microorganismos, quedando pendiente en este trabajo c) los flujos de materia y energía.

Al respecto, se determinó la diversidad microbiana basal de las muestras control y además, se determinó la diversidad, estructura y composición de la comunidad bacteriana y arquea de los tapetes microbianos sujetos a tratamientos, en los que se adicionó sustratos fermentables como la glucosa o betaína, en experimentos de microcosmos, lo que permitió responder a la pregunta de esta investigación: ¿Existen ejemplos de relaciones metabólicas constituidas entre bacterias fermentadoras de glucosa o betaína con arqueas metanogénicas?

Los resultados mostraron evidencias que sugieren que, para el caso de los tratamientos con betaína, si pueden existir relaciones metabólicas constituidas entre bacterias fermentadoras de betaína, que resulta en la producción de TMA, sustrato empleado por arqueas metanogénicas en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos.

Estas relaciones de cooperación entre bacterias fermentadoras con arqueas metanogénicas metilotróficas en los tratamientos con adición de betaína son las que respaldaron la aceptación de una de nuestras hipótesis 4.1. Se sugiere que la adición del sustrato betaína en los experimentos de microcosmos, promovió el crecimiento de bacterias fermentadoras con la producción de trimetilamina (TMA), la cual fue usada como sustrato por las arqueas metanogénicas metilotróficas que fueron detectadas a través de secuencias que codifican para el 16S ARNr".

Mientras que para la hipótesis 4.2. "Se espera que la adición del sustrato glucosa en los experimentos de microcosmos promueva el crecimiento de bacterias fermentadoras que producen hidrógeno, acetato y dióxido de carbono, los que podrán ser usados como sustratos por las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas las que serán detectadas a través de secuencias que codifican para el 16S ARNr", no se encontraron evidencias que la soportaran,

es decir la ausencia de relaciones entre bacterias fermentadoras de glucosa con arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas.

Aunque existe una amplia gama de investigaciones enfocadas en la exploración de la biodiversidad presente en los tapetes microbianos de ambientes hipersalinos de Guerrero Negro (Des Marais, 2003; Ley et al., 2006; García-Maldonado et al., 2012, 2015, 2018, 2023; Kelley et al., 2015; Cadena et al., 2018) donde se han documentado los grupos funcionales presentes en condiciones naturales, existen escasas investigaciones que ofrezcan evidencias claras sobre el intercambio de productos metabólicos entre bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas con la finalidad de llevar a cabo el proceso de metanogénesis en este tipo de ambientes hipersalinos. De manera particular, existen pocos antecedentes publicados sobre este tipo de relaciones metabólicas en los tapetes microbianos de Exportadora de Sal (ESSA). El trabajo realizado por Lee et al., 2014 es un acercamiento a este tipo de interacciones, enfocado en la cooperación entre bacterias fermentadoras del Phylum Chloroflexi y bacteria sulfato reductoras para contribuir junto con cianobacterias en el ciclo del hidrogeno en tapetes microbianos.

Así mismo, la detección e identificación de estos grupos de microorganismos, sus potenciales metabolismos y su coexistencia en una misma comunidad son una clara contribución al conocimiento sobre relaciones de cooperación metabólica, destacando la importancia de las bacterias fermentadoras en la actividad de las comunidades metanogénicas.

En relación con el cumplimiento del objetivo general: “Bioexplorar a través de la estimulación con sustratos orgánicos el desarrollo de poblaciones de bacterias fermentadoras y de arqueas metanogénicas en tapetes microbianos hipersalinos”. Se cuenta con evidencias que dan respuesta al cumplimiento de este objetivo.

Sin embargo, aunque el gen 16S ARNr ha demostrado ser crucial para la descripción y caracterización de comunidades microbianas de diversos ambientes, especialmente para el caso de microorganismos no cultivables, la comparación entre estudios sobre comunidades microbianas puede verse sesgada por los diferentes parámetros metodológicos utilizados en cada investigación, incluso siendo el uso de las mismas métricas de sus metodologías no significativa

para permitir una comparación directa (Valenzuela-González et al., 2015; Shade, 2017). La confirmación de producción de metano fortaleció la evidencia obtenida sobre la existencia de estas relaciones entre bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas en los tratamientos enriquecidos.

En relación con los objetivos particulares se encontraron evidencias parciales como se describe a continuación:

8.1 Enriquecimiento de comunidades bacterianas en experimentos de microcosmos.

El enriquecimiento de grupos microbianos específicos utilizando glucosa o betaína como sustratos fermentables, se confirmó mediante la diversidad, estructura y composición de las comunidades microbianas de cada tratamiento y utilizando de referencia la comunidad presente en los tratamientos control (Escobar-Zepeda et al., 2015). Para ello, los índices de alfa y beta diversidad fueron indicadores adecuados para comprender la estructura y composición de este tipo de comunidades (Magurran, 2004) y diferencias entre ellas. La alfa diversidad mostró evidencia de una mayor riqueza y diversidad de taxones en las comunidades microbianas de los tratamientos control de ambos sitios de estanques de ESSA (A4N5 y A5) en contraste con los tratamientos enriquecidos. Dicho control fue un reflejo de la naturaleza de muestras ambientales que son escasamente manipuladas en contraste con muestras que han sido sometidas a condiciones específicas que enriquecen a determinados grupos de microorganismos que emplean metabolismos anaerobios, como es el caso de los tratamientos enriquecidos con glucosa o betaína (Escalante, 2007). Por lo tanto, los tratamientos control son los que mostraron una mayor diversidad y riqueza de taxones seguidos por los tratamientos enriquecidos con betaína y finalmente los tratamientos enriquecidos con glucosa, los cuales muestran una mayor proliferación de grupos determinados y menor heterogeneidad de los mismos (Almela et al., 2021). Así mismo, la beta diversidad mostró evidencia de que los microorganismos de los tratamientos enriquecidos con betaína están más estrechamente relacionados con la comunidad microbiana de los tratamientos Control (Lozupone y Knight, 2005), posiblemente debido a que este sustrato fermentable es encontrado en condiciones naturales dentro de los tapetes microbianos como un producto de una serie de etapas hidrolíticas en las que intervinieron grupos

bacterianos para la obtención de monómeros más sencillos como la betaína, que es utilizada como un osmoregulador por una gran cantidad de grupos de bacterias y arqueas (King, 1984; Oren, 1990). En contraste, el tratamiento enriquecido con glucosa mostró en la distribución de sus réplicas una menor proximidad filogenética y abundancia relativa con los tratamientos control. Sugiriendo una notable divergencia estructural de la comunidad microbiana del tratamiento enriquecido con glucosa en contraste con los demás tratamientos. Esta notable divergencia en las comunidades puede deberse a la ausencia de este sustrato en condiciones naturales dentro de los tapetes microbianos, donde usualmente es encontrado el glucógeno. Este polímero funge en una gran gama de microorganismos como un reservorio energético que está conformado por cadenas ramificadas de glucosa, polímero que se sintetiza en condiciones abundantes de nutrientes y que se degrada cuando los nutrientes escasean, permitiéndoles de esta manera sobrevivir ante fluctuaciones en el ambiente y a generar una respuesta rápida a las condiciones cambiantes en condiciones naturales, el glucógeno no es utilizado tan fácilmente como la glucosa por la mayoría de las comunidades bacterianas (Preiss, 1984). En esta investigación, la potencial ventaja de algunos grupos de microorganismos para el uso de este sustrato sobre los demás grupos fue lo que evidencio esta estructura comunitaria tan divergente de la comunidad de los tratamientos control (Mouné et al., 2000).

Así mismo se observó evidencia que respalda la existencia de un enriquecimiento de grupos bacterianos y arqueas específicos en cada uno de los tratamientos en relación directa al sustrato orgánico fermentable que se adiciono. El sustrato de glucosa permitió apreciar una estructura bacteriana más divergente que la comunidad de referencia de los tratamientos control.

La asignación taxonómica de los grupos que componen estas comunidades resaltó el Phylum Halanaerobiaeota como el grupo mejor representado dentro de todos los tratamientos con intervalos de abundancia relativa que van de 4.87-39.07% en los tratamientos control. Este Phylum mostró un mayor con intervalos de 15.53 a 48.81% en los tratamientos enriquecidos con betaína y en los tratamientos enriquecidos con glucosa presentó intervalos de abundancia relativa de 78.52 a 99.80%, por lo que, el desarrollo de este grupo de microorganismos es evidentemente mayor en los tratamientos enriquecidos con sustratos orgánicos. En este análisis se detectó la Clase Halanaerobiia, asociada a ambientes anóxicos y concentraciones elevadas de

salinidad. Dentro de este grupo se encuentra el Orden de los Halanaerobiales que se caracterizan por presentar usualmente un metabolismo anaerobio fermentativo en este tipo de ambientes hipersalinos (Oren, 2011).

El segundo mejor representado fue el Phylum Desulfobacterota, el cual está compuesto únicamente por representantes de bacterias sulfato reductoras. Este grupo presentó intervalos de abundancia relativa que van del 11.38-29.71% en los tratamientos Control, con un mayor desarrollo en los tratamientos enriquecidos con betaína mostrando intervalos de 3.68-42.40% y con un gran declive de 0.24-4.79% en los tratamientos enriquecidos con glucosa. A este grupo pertenecen las Clases Desulfovibrionia y Desulfobacteria, en las que se encuentran grupos de bacterias sulfato reductoras que juegan un papel indispensable dentro de los tapetes microbianos al llevar a cabo el proceso de sulfato reducción que suele estar asociado al mismo tipo de ambientes donde ocurre el proceso de metanogénesis. Estos grupos se caracterizan por ser capaces mediante un metabolismo anaerobio de utilizar los sulfatos como aceptor de electrones y sustratos orgánicos e inorgánicos como donares de electrones, contribuyendo de esta forma al ciclo del azufre en condiciones naturales (Des Marais, 2003; Bradley et al., 2011).

El siguiente en orden de abundancia, fue el Phylum Firmicutes con intervalos de abundancia relativa de 0.68-3.74% en los tratamientos Control, un notable aumento con intervalos de 5.71-50.86% en los tratamientos enriquecidos con betaína y un leve aumento en contraste con el tratamiento control con intervalos de abundancia que van desde 0.22-7.95% en los tratamientos enriquecidos con glucosa. A este grupo pertenece la Clase Clostridia, a la cual se asocia el Orden Peptostreptococcales-tissierelalles caracterizado por ser un grupo de bacterias anaerobias comúnmente encontradas en una amplia diversidad de ambientes y asociada en algunos casos al microbiota intestinal de seres vivos. Dentro de este Orden el género *Clostridiisalibacter* está asociado a aguas residuales y se caracteriza por ser moderadamente halófilo y anaerobio estricto. Este género se ha documentado con un buen desarrollo en presencia de extracto de levadura y con la capacidad para utilizar piruvato, fumarato y succinato (Liebgott et al., 2008; Whitehead et al., 2011).

Las secuencias del gen 16S ARNr asignadas al Phylum Bacteroidota fueron muy abundantes con intervalos de abundancia que van de 3.32-29.36% en los tratamientos Control, un leve

incremento en los intervalos que van de 1.72-32.57% en los tratamientos enriquecidos con betaína y con una abundancia relativa menor de 0.55-3.49% en los tratamientos enriquecidos con glucosa. Entre los grupos detectados en este Phylum se encontró la Clase Bacteroidia a la que está asociado el Orden Bacteroidales, bacterias con metabolismo anaerobio estricto y entre los que se asocia la Familia Marinilabiliaceae, con representantes halófitos fermentativos. Además, a este Phylum se asocia el Orden Sphingobacteriales siendo detectado en este estudio con intervalos de abundancia relativa de (1.08-4.29%) en el tratamiento enriquecido con betaína y es caracterizado por microorganismos no fotosintéticos. En este último grupo, se ha documentado su capacidad de producir esfingolípidos que juegan un papel clave en la formación de membranas citoplasmáticas. Estos Ordenes se encuentran ampliamente distribuidos en todo tipo de ambientes acuáticos como son los sistemas hipersalinos, tapetes microbianos, sedimentos y endoevaporitas. Además, suelen encontrarse en grandes abundancias dentro de los tapetes microbianos y asociarse con importantes contribuciones al ciclo del carbono por su capacidad de descomponer la materia orgánica compleja (O'Sullivan et al., 2006; Ley et al., 2006; Stivaletta et al., 2011; Harris et al., 2013; Liu et al., 2014; Fernández et al., 2016).

El Phylum Spirochaetota fue detectado en gran medida en ambos sitios de ESSA con intervalos de abundancias relativas en los tratamientos Control de 4.92-18.16%, mostrando un decremento en las abundancias de los tratamientos enriquecidos con betaína (0.54-14.38%) y glucosa (1-3.76%). Dentro de este grupo se encuentra la Clase Spirochaetia la cual está asociada al Orden Spirochaetaceae que se ha detectado en ambientes con condiciones anóxicas que presentan hidratos de metano (Inagaki et al., 2003).

El Phylum Planctomycetota fue detectado con intervalos de abundancia desde 6.30-20.96% en los tratamientos Control y con intervalos de 1.17-9.27% mostrando un menor desarrollo en los tratamientos enriquecidos con betaína y de 0.83-5.88% en los tratamientos enriquecidos con glucosa. Este grupo se caracteriza por representantes sin pared celular y que habitan desde ambientes acuáticos dulces hasta marinos. Perteneciendo a este grupo las Clases Phycisphaerae, Planctomycetes y VadinHA49 (Sagulenko et al., 2014).

El Phylum Thermotogota que se caracteriza por presentar una amplia gama de bacterias termófilas e hipertermófilas con un metabolismo capaz de utilizar carbohidratos como fuente de

energía se detectó en los tratamientos control con intervalos de abundancia relativa que van de 3.11-11.86%, mostrando un declive muy notable en su abundancia en los tratamientos enriquecidos con betaína (0.30-4.66%) y glucosa (0.14-2.11%). A este grupo pertenece la Clase Thermotogae, en la que se han descrito genes probablemente de origen Archaea, revelando una posible transferencia horizontal de genes entre estos dos dominios (Nesbo et al., 2001).

Otros grupos del dominio Bacteria que fueron detectados principalmente en los tratamientos Control y que sus intervalos de abundancias relativas disminuyeron en los tratamientos enriquecidos, fueron los Phylum Proteobacteria con intervalos de abundancia relativa de (1.17-16.57%) en los tratamientos Control y con intervalos menores de 1% en los tratamientos enriquecidos. Dentro de este grupo predominan las clases α y γ proteobacteria, siendo este grupo importante dentro de los tapetes microbianos de Exportadora de sal en condiciones naturales, debido a su papel en el ciclo del azufre al comprender bacterias purpuras del azufre como son el caso de la clase I grupo Gamma γ proteobacterias., Así mismo, los representantes del grupo α también son relevantes ya que comprenden a las bacterias purpuras no sulfurosas las cuales presentan un metabolismo fotótrofo anaeróbico anoxigénico (Van Gemerden, 1993; Garrity et al., 2001).

El Phylum Synergistota caracterizado por representantes de bacterias anaerobias que se suelen detectar en la mayoría de los ambientes anóxicos, mostraron en los tratamientos Control intervalos de abundancia relativa de 0.34-0.84% y que se vieron favorecidos en el tratamiento de betaína (0.10-2.62%) y desfavorecidos con un valor promedio $<0.3\%$ en los tratamientos enriquecidos con glucosa. Perteneciendo a este grupo la Clase Synergistia a la cual se asoció principalmente la Familia Synergistaceae caracterizado por tener representantes con un metabolismo anaerobio fermentativo (Baena et al., 2000; Jumas-Bilak et al., 2009).

Finalmente, el Phylum Thermoplasmata fue el más representativo para el dominio Arquea en los tratamientos Control con intervalos de (0.17-1.79%) y seguido en los tratamientos enriquecidos con betaína (0.1-1.29%). Mostrando representantes de la clase Thermoplasmata y llegando hasta una asignación del género *Marine Benthic Group D and DHVEG-1*, grupo de arquea detectado en abundancias considerables en una gran variedad de ambientes dentro de los

sedimentos marinos, estuarios, ventilas y chimeneas hidrotermales marinas. Este grupo de microorganismos se caracteriza por ser termófilos, acidófilos y heterótrofos, asociado a un papel clave en el ciclo de metano al llevar a cabo la oxidación de metano en condiciones anaerobias (Shi et al., 2021; Zhang et al., 2022). En el tratamiento enriquecido con betaína el Phylum Halobacterota fue el más representativo detectándose principalmente la Clase Methanosarcinia y en mucho menor abundancia la Clase Methanomicrobia, siendo principalmente apreciable estos grupos de arquea metanogénica, en los tratamientos enriquecidos con sustrato de betaína con intervalos de abundancia relativa de (0.28-0.70%) y en menor abundancia relativa con un único caso de 0.17% en la réplica "C" del tratamiento control de Área 5 (A5). Este grupo de arqueas es muy relevante en la producción de metano al llevar a cabo la metanogénesis mediante la vía metabólica metilotrófica. Además, los miembros de Methanosarcinia encontrados en ambientes marinos con elevadas salinidades, se caracterizan por ser los metanógenos con la mayor gama de sustratos para llevar a cabo la metanogénesis, al utilizar compuestos metilados como metanol, betaína, trimetilamina, metilaminas y metiletanolaminas (Garrity et al., 2001; Oren, 2011; García-Maldonado et al., 2018; Lyu y Liu, 2019).

No obstante, se debe mencionar que para la asignación taxonómica del dominio Arquea a través del gen 16S ARNr también se detectó en menor medida con abundancias relativas menores del 0.3% en algunas réplicas del tratamiento Control y el tratamiento enriquecido con betaína de ambos sitios de ESSA, otros Phyla de arqueas metanogénicas como son el Phylum Euryarchaeota; Orden Methanofastidiosales y secuencias del Phylum Thermoplasmata; Orden Methanomassilicoccales; género *Methanomethylophilaceae*, secuencias que se han asociado a sedimentos marinos y que están muy bien representados en muestras ambientales de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de Exportadora de Sal, S.A de C.V. (Zhang et al., 2020; García-Maldonado et al., 2023).

Además, se detectaron en abundancias muy bajas arqueas no metanogénicas del Superphylum Asgard, Phylum Asgardarchaeota; Ordenes Lokiarchaeia y Odinarchaeia, linajes que han sido documentados en entornos anaerobios y el análisis de su genoma los ha colocado como microorganismos potencialmente mixotróficos con metabolismos divergentes como son la fijación de CO₂, acetogénesis y participación en la degradación de materia orgánica (Cai et al.,

2018, 2021). Además, también se detectó al superphylum DPANN, Phylum Microarchaeota; Orden Micrarchaeales y Phylum Nanoarchaeota; Orden Woesearchaeales que se caracterizan por presentar una gran capacidad de adaptación con un metabolismo heterótrofo y con la tendencia de encontrarse en ambientes diversos como son los tapetes microbianos, lagos, acueductos subterráneos y drenaje de minas (Chen et al., 2018).

Otros grupos detectados con intervalos de abundancia relativa menores del 3% en los tratamientos Control y con una considerable disminución de su abundancia relativa en los tratamientos enriquecidos fueron los Phylum metabólicamente diversos de Chloroflexi y Verrucomicrobiota. Este último, abarca representantes con la capacidad de oxidar el metano presente en el sedimento en condiciones naturales. Finalmente, con muy baja abundancia relativa se detectaron secuencias del Phylum Cyanobacteria la cual se encuentra usualmente en grandes abundancias en condiciones naturales dentro de los tapetes microbianos, siendo uno de los principales grupos que funge como un productor primario del ciclo del carbono y participa junto con bacterias fermentadoras como Chloroflexi y bacterias sulfato reductoras en el ciclo del hidrogeno en este tipo de ambientes hipersalinos (Abed et al., 2010; Lee et al., 2014).

Por lo tanto, para asignaciones a niveles taxonómicos más específicos en la presente investigación se determinó que el enriquecimiento con sustrato fermentable de betaína estimulo principalmente el crecimiento de grupos de bacterias halófitas anaerobias con metabolismo fermentativo del Orden Halanaerobiales, género *Halanaerobium* y *Orenia*; bacterias sulfato reductoras de la Familia Desulfohalobiaceae, género *Desulfovermiculus*, Familia Desulfovibrionaceae, género Desulfovibrio y la Familia *Desulfoplanaceae*, género *Desulfoplanes*. También estimuló el crecimiento de bacterias anaerobias de la Familia Spirochaetaceae, género *Sediminispirochaeta* y *Spirochaeta_2* y la Familia Peptostreptococcales-Tissierellales, género *Clostridiisalibacter* y *Peptoclostridium*. Finalmente, se estimuló principalmente el desarrollo de un grupo de arquea halófitas metanogénicas de la Familia Methanosarcinaceae; género *Methanohalophilus*. Además del grupo de arquea de la Clase Thermoplasmata; género *Marine Benthic Group D and DHVEG-1*.

Los microcosmos enriquecidos con sustrato fermentable de glucosa mostraron estimular en gran medida el crecimiento y desarrollo de miembros de bacterias halófitas anaerobias con metabolismo fermentativo de la Familia Halobacteroidaceae, género *Orenia*; seguido en una escala considerablemente menor de miembros del Orden Halanaerobiales, género *Halanaerobium*. De la misma manera, también se enriquecieron otros grupos de bacterias que solo se registraron en las comunidades donde las extracciones de ácidos nucleicos fueron a partir de muestras de núcleos de tapete microbiano, detectándose a miembros de bacterias sulfato reductoras de la Familia Desulfohalobiaceae, género *Desulfovermiculus* y la Familia Desulfomicrobiaceae, género *Desulfoplanes*, además de miembros de bacterias anaerobias de la Familia Spirochaetaceae, géneros *Sediminispirochaeta* y *Spirochaeta_2*; y la Familia Peptostreptococcales-Tissierellales; género *Clostridiisalibacter*.

8.2 Reconstrucción de los procesos de cooperación metabólica dentro del tapete microbiano a partir de grupos detectados

La secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr pese a ser una excelente herramienta para la comprensión y entendimiento de la riqueza y diversidad de comunidades microbianas, no es capaz de establecer evidencia directa de las relaciones metabólicas de una comunidad microbiana (Oyewusi et al., 2021). Por lo tanto, la detección de este tipo de relaciones se logró por inferencia mediante la identificación de diversos grupos microbianos como son las bacterias fermentadoras y su capacidad de degradar sustratos orgánicos para generar productos metabólicos que pueden ser utilizados por arqueas metanogénicas para llevar a cabo la metanogénesis. Gracias a la detección de este tipo de gremios microbianos particulares se permitió inferir sobre la dinámica poblacional y las interacciones dentro de este tipo de estructuras.

La cooperación metabólica entre grupos microbianos anaerobios en condiciones anóxicas se ha registrado en diversos estudios, donde el enfoque principal y de posibilidad para el entendimiento de estas interacciones es mediante la dinámica poblacional, la inferencia de productos metabólicos generados por un grupo y su consumo por otro (McInerney et al., 1979; Narihiro et al., 2015; Hug y Co, 2017).

Existen registros de este tipo de incubaciones que presentan condiciones anóxicas y que están enfocadas en favorecer el metabolismo anaerobio, un óptimo desarrollo y dominancia de los grupos de Firmicutes, Synergistota, Bacteroidota y Halobacterota. La proliferación de estos mismos grupos se apreció su proliferación en esta investigación, con condiciones similares (Hardy et al., 2021). Además, estudios previos han detectado a través del marcador 16S ARNr a miembros del género *Halanaerobium*, capaces de fermentar azúcares como la glucosa y betaína como sustrato, presentando un metabolismo fermentativo muy versátil en este tipo de ambientes (Tsai et al., 1995; Kobayashi et al., 2000; Brown et al., 2011). También, se han detectado de la Familia de Synergistaceae representantes del género *Aminobacterium* los cuales son capaces de fermentar aminoácidos en presencia de extracto de levadura (Baena et al., 2000).

En cuestión de los grupos de bacterias sulfato reductoras detectadas en las comunidades microbianas del presente estudio, representadas principalmente por los Ordenes Desulfovibrionales y Desulfobacterales, se toma en consideración que la reducción de sulfato es el sistema respiratorio anaerobio dominante dentro de ecosistemas anóxicos como son los tapetes microbianos hipersalinos que muestran un gradiente redox negativo en las capas internas del mismo (King, 1983; King, 1988; Belyakova et al., 2006; Nobu et al., 2015). Este grupo se asocia a la metanogénesis que representa uno de los pasos finales en la degradación anaerobia de la materia orgánica y que ocurre después de que otros aceptores de electrones han sido utilizados en este tipo de entornos como son el oxígeno, nitrato y sulfatos (Des Marais, 2003; Bebout et al., 2004; Orphan et al., 2008; Schink y Stams, 2013; García-Maldonado et al., 2012, 2023). Mientras que la proliferación de la Familia Peptostreptococcales-Tissierellales puede deberse a una potencial cooperación metabólica, como ocurre con parientes cercanos de este grupo como son del género *Clostridium* que tiene representantes asociados en los pasos previos de la metanogénesis en condiciones naturales, como son las etapas hidrolíticas en las que se rompen enlaces complejos de algunas proteínas, lípidos a monómeros o moléculas como aminoácidos y glucosa, además de su colaboración en la fermentación de azúcares y aminoácidos.

Para el enriquecimiento de comunidades microbianas con sustratos orgánicos, está bien documentado que el sustrato orgánico de glucosa es uno de los azúcares más ampliamente utilizado por una gran gama de microorganismos mediante una amplia diversidad de

metabolismos. El metabolismo anaerobio fermentativo es uno de los más empleados dentro de ambientes hipersalinos para el aprovechamiento de este sustrato. Por lo tanto, esto explicaría el desarrollo óptimo y predominante de la bacteria anaerobia fermentativa del género *Orenia* (Rainey et al., 1995; Mouné et al., 2000; Dong et al., 2016) y seguido en mucha menor escala del género *Halanaerobium* (Kobayashi et al., 2000), de los cuales se han registrado representantes con la capacidad de degradar a la glucosa mediante la fermentación ácida mixta, que consiste en metabolizar la glucosa a través de la glucólisis para formar piruvato, el cual se convierte en diversos productos (Mouné et al., 2000). El metabolismo de la glucosa probablemente es una ventaja metabólica sobre los demás grupos presentes en el tapete microbiano. El producto metabólico generado de esta fermentación es generalmente el hidrógeno, acetato y dióxido de carbono. Productos que pueden ser utilizados por una amplia gama de microorganismos anaerobios como fuente de energía o donador de electrones como es el caso del uso del hidrogeno por las arqueas metanogénicas y bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Des Marais, 2003; Hardy et al., 2021). Sin embargo, la comunidad microbiana enriquecida con este sustrato no muestra el desarrollo de arqueas metanogénicas ni la producción de metano, por lo que no es evidente en este estudio una relación o cooperación metabólica entre este grupo de bacterias anaerobias fermentativas con algún grupo de arquea metanogénica capaz de utilizar los productos metabólicos que generan.

Por otro lado, el sustrato orgánico de betaína además de utilizarse como un osmoprotector, también puede ser utilizado por una gran cantidad de phyla microbianos para la obtención de energía, usualmente mediante la reducción o la desmetilación de este sustrato. Los productos derivados del uso de la betaína por bacterias fermentadoras suelen ser trimetilamina y acetato (King, 1984; Heijthuisen y Hansen, 1989; Oren, 1990). Los productos como el acetato pueden ser oxidados por las bacterias sulfato reductoras (King, 1984) o bacterias anaerobias y la TMA es utilizada por arqueas metanogénicas metilotróficas como el género *Methanohalophilus* (García-Maldonado et al., 2023), aunque también se han registrado bacterias con metabolismos versátiles capaces de degradar la TMA (Kim et al., 2003). Otra forma en que la TMA es obtenida en condiciones naturales dentro de los tapetes microbianos es a partir de la reducción bacteriana de Oxido de Trimetilamina (TMAO) a TMA (Strom et al., 1979; Oren, 1990). Sin embargo, las condiciones del experimento de incubación de esta investigación se llevaron a cabo con ausencia

de oxígeno (condiciones anóxicas), por lo que el proceso de oxidación se vio limitado o nulificado para resaltar procesos propios del metabolismo anaerobio.

Los resultados obtenidos en la presente investigación representan una posible evidencia de la potencial cooperación metabólica entre bacterias fermentadoras de betaína del género *Halanaerobium* y arqueas metanogénicas del género *Methanohalophilus* que emplean la vía metilotrónica dentro de los tapetes microbianos, utilizando de esta forma la trimetilamina (TMA) generado por bacterias fermentadoras. Las vías de reducción y desmetilación de betaína son los factores clave y de posibilidad para esta relación. Además, se debe tomar en cuenta que la betaína es un osmoregulador utilizado por una gran variedad de microorganismos como es el caso del género *Methanohalophilus* (An et al., 2019).

Estudios recientes ofrecen más evidencias sobre la cooperación metabólica entre estos dos grupos, estudios que contemplan las vías metabólicas de *Halanaerobium* para la reducción de betaína mediante el complejo betaína reductasa, la cual es llevada a cabo por los genes *Opu* que funcionan como el transportador de la betaína hacia el interior de la bacteria fermentadora y el gen *GrdHI* que convierte la betaína a trimetilamina y acetil-CoA. Finalmente, en este proceso el gen *MttP* transporta las moléculas de TMA de la bacteria fermentadora a la arquea metanogénica para su conversión en metano mediante el gen *MttB*. En este proceso la TMA es degradada consecutivamente a Dimetilamina (DMA), Monometilamina (MMA) y finalmente a Metano (CH₄). Además de este proceso, la betaína también es directamente utilizada por la arquea metanogénica del género *Methanohalophilus* mediante el gen *Opu* que transporta este sustrato a su interior y el gen *MtgB* que lleva a cabo la desmetilación de la betaína que da como resultado un grupo metil (-CH₃) que favorece la metanogénesis y la dimetilglicina (DMG) que sirve como un compuesto crioprotector para *Methanohalophilus* y *Halanaerobium* (Fig. 9) (Borton et al., 2018; An et al., 2019; Li et al., 2021).

La desmetilación anaeróbica de la betaína también es llevada a cabo por bacterias sulfato reductoras y bacterias acetogénicas mediante la betaína transferasa (*MtgB*). Siendo que estos grupos de anaerobios también suelen ser capaces de metabolizar el grupo metil (-CH₃) producido de la desmetilación de betaína (Heijthuisen y Hansen, 1989; Li et al., 2021; Lechtenfeld et al., 2018).

En cuestión del grupo de arquea del Orden Thermoprofundales; género *Marine Benthic Group D* and *DHVEG-1* se ha documentado una frecuente coexistencia con los grupos de Lokiarchaeota y arqueas metanogénicas anaerobias, lo que sugiere la existencia de interacciones de cooperación metabólica o presiones selectivas similares que aún se mantienen desconocidas (Inagaki et al., 2006; Zhou et al., 2018).

Dentro de la relación metabólica entre el género *Halanaerobium* y *Methanohalophilus* se ha registrado el óptimo desarrollo y estrecha asociación con el Orden Sphingobacteriales, al cual se le adjudica esta relación con su participación en una ruta metabólica poco conocida dentro del ciclo del carbono en ambientes extremos (Wang et al., 2017; An et al., 2019).

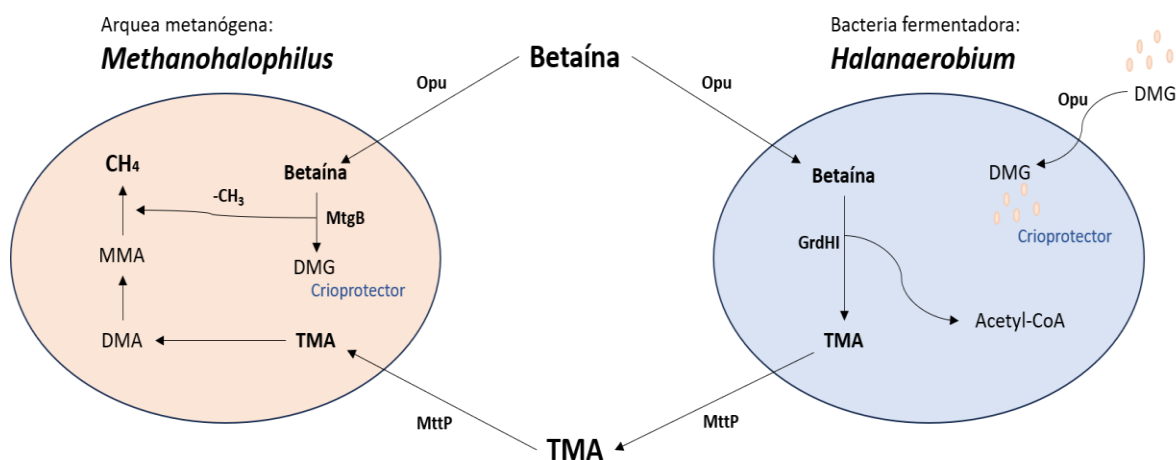


Figura 9. Representación esquemática teórica de la cooperación metabólica entre bacteria fermentadora (*Halanaerobium*) y arquea metanogénica (*Methanohalophilus*) para la conversión de betaína a metano (CH₄) dentro de un núcleo de tapete microbiano de Exportadora de Sal en experimento de microcosmo enriquecido con sustrato de betaína. La betaína es transportada por el gen *Opu* al interior de los microorganismos y utilizada generalmente como un osmoprotector o reducida a trimetilamina (TMA), y acetyl-CoA mediante el complejo betaína reductasa representado por el gen *GrdHI*. La TMA es transportada de la bacteria fermentadora del género *Halanaerobium* (célula azul) a la arquea metanogénica del género *Methanohalophilus* (célula naranja) mediante la vía transportadora de TMA representada con el gen *MttP*, seguida de la conversión a Dimetilamina (DMA), Monometilamina (MMA) y finalmente metano (CH₄) a través de la vía metanogénica metilotrófica que emplea *Methanohalophilus*. La betaína también es desmetilada a dimetilglicina (DMG) y a un grupo metil (-CH₃). La DMG es utilizada como un crioprotector y el grupo metil un facilitador de la metanogénesis.

8.3 Relación entre los análisis de producción de metano y las diferencias en las comunidades microbianas

La detección de metano mediante el método de cromatografía de gases nos permitió obtener la confirmación de producción de metano en los tratamientos enriquecidos con betaína, que mostraron concentraciones más elevadas de metano que los tratamientos control que sirvieron como una referencia de la producción de metano por parte de la comunidad microbiana sin enriquecimiento con sustrato orgánico de ambos sitios de ESSA. Además, se aprecia en este análisis como el tratamiento control del sitio A5 muestra una comunidad microbiana con mayor actividad metanogénica en contraste con A4N5 la cual mostro valores muy bajos o nulos a lo largo de la escala temporal de la investigación. Un mayor desarrollo de comunidades metanogénicas dentro de las muestras enriquecidas con betaína fue evidente, por lo que, es muy posible la cooperación metabólica entre bacterias fermentadoras de este sustrato como el género *Halanaerobium* con arqueas metanogénicas que empleen la vía metilotrófica como el género *Methanohalophilus*. Estos grupos se confirmaron en la caracterización taxonómica en este tratamiento. Además, se toma en consideración en segundo plano la productividad metanogénica de los demás grupos de arqueas metanogénicas detectadas en bajas abundancias en este tratamiento como son el Orden Methanofastidiosales y Methanomassilicoccales (García-Maldonado et al., 2023), también tomando en cuenta la contribución en el ciclo de metano de la Clase Thermoplasmata; género *Marine Benthic Group D and DHVEG-1* (Zhou et al., 2018).

El tratamiento enriquecido con glucosa de ambos sitios no mostró lecturas de metano significativas, además de ser incluso menores en gran medida al compararse con los tratamientos Control que sirvieron como referencia y que presento la tendencia de ir disminuyendo a cero la poca producción que tenía el tratamiento en área 5 (A5). Incluso siendo la determinación de glucosa realizada en esta investigación una confirmación que nos permite inferir el consumo de este sustrato por parte de la comunidad microbiana en el experimento de microcosmos. Por lo anterior, se infiere que este sustrato no favoreció el desarrollo de comunidades de bacterias fermentadoras que presenten una cooperación metabólica con arqueas metanogénicas en este tipo de ambientes hipersalinos y estructuras microbianas, e incluso existiendo la posibilidad de que se generara una competencia entre diversos grupos de microorganismos por el uso de este

sustrato orgánico fermentable. Sin embargo, mediante la caracterización taxonómica de la comunidad bacteriana, el consumo de este sustrato parece favorecer a bacterias fermentadoras del género *Orenia* y *Halanaerobium* que son capaces de producir hidrógeno, dióxido de carbono y acetato al utilizar este sustrato (Mouné et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Dong et al., 2016). Estos productos podrían ser utilizados por arqueas que emplean la vía hidrogenotrófica y acetoclástica, no obstante, estos grupos no se detectaron en este tratamiento y la producción de metano fue prácticamente nula.

Así mismo, tomando en cuenta que la comunidad microbiana en los tratamientos enriquecidos con glucosa mostró abundancias relativas altas correspondientes a estas bacterias halófilas anaerobias obligadas del género *Orenia*, y en menor medida del género *Halanaerobium* capaces de fermentar este sustrato, además de que no existió una detección significativa de arqueas metanogénicas. Se infiere, por lo tanto, que no existe evidencia que respalde la cooperación metabólica entre bacterias fermentadoras de glucosa con arqueas metanogénicas en esta investigación.

La comunidad microbiana de los tratamientos enriquecidos con betaína presentaron abundancias relativas altas de bacterias halófilas anaerobias obligadas del género *Halanaerobium* capaces de fermentar la betaína a TMA y de arqueas metanogénicas metilotróficas halófilas del género *Methanohalophilus*, que se sabe emplea TMA para llevar a cabo la metanogénesis. Por ello, se infiere que las evidencias obtenidas en esta investigación respaldan la potencial cooperación metabólica entre bacterias fermentadoras de betaína con arqueas metanogénicas que emplean la vía metilotrófica.

A la luz de las evidencias obtenidas, se infiere que la degradación de la materia orgánica en tapetes microbianos que resulta en la producción de metano involucra relaciones metabólicas de cooperación entre bacteria fermentadoras y arqueas metanogénicas.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación reflejan la amplia diversidad de comunidades microbianas con un metabolismo anaerobio presente en los tapetes microbianos de ambientes hipersalinos de los sitios A4N5 y A5 de los estanques de Exportadora de Sal (ESSA) en Guerrero Negro, Baja California Sur. Detectando mediante el uso de ASVs los grupos de bacterias y arqueas que dominan en estas condiciones y perfilando su estructura comunitaria.

Esta investigación contribuye en la identificación y comprensión de potenciales relaciones metabólicas entre bacterias anaerobias fermentativas y arqueas metanogénicas presentes en ambientes hipersalinos. Esto a través de la identificación y caracterización de los taxones microbianos asociados al metabolismo fermentativo y al metabolismo metilotrófico para llevar a cabo la metanogénesis, proceso que se encuentra asociado a la biodegradación completa de la materia orgánica.

La determinación de la actividad metanogénica mediante la cuantificación de la producción de metano en condiciones controladas nos permite confirmar que las arqueas productoras de metano se encuentran activas.

La reconstrucción de la cooperación metabólica entre gremios microbianos asociados mediante la fermentación de sustratos específicos de glucosa o betaína y la posterior degradación de los productos resultantes, nos permite un mayor entendimiento de los procesos asociados a la biodegradación completa de la materia orgánica dentro de los tapetes microbianos de ambientes hipersalinos. Procesos que culminan en condiciones naturales en la producción de metano, dióxido de carbono e hidrógeno.

9.1 Perspectivas

La exploración de las rutas metabólicas y procesos de cooperación microbiana proporcionan conocimientos de referencia relevante para posteriores estudios enfocados en la dinámica poblacional, aprovechamiento y determinación de grupos funcionales.

El estudio de este tipo de relaciones metabólicas mediante un enfoque de transcriptómica y metagenómica funcional, permitirán ampliar la comprensión de los procesos biológicos asociados a la dinámica poblacional y estructura comunitaria de este tipo de macroestructuras biológicas característica de ambientes hipersalinos.

La determinación de las relaciones de cooperación metabólica entre bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas metilotróficas, mediante el uso de antibióticos específicos como la ampicilina que inhibe la síntesis de la pared celular de microorganismos del dominio Bacteria en experimentos de incubación en condiciones anóxicas, proporcionará una mayor evidencia de la existencia de una dependencia directa o indirecta de las arqueas del género *Methanohalophilus* con bacterias del género *Halanaerobium* para llevar a cabo la metanogénesis. Así mismo, el cultivo puro y cocultivo de estos géneros proporcionara información relevante de la productividad y consumo de los productos metabólicos generados por ambas partes.

10. LITERATURA CITADA

- 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 253–273. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2_13
- Almela, P., Justel, A., Quesada, A. (2021). Heterogeneity of microbial communities in soils from the Antarctic Peninsula region. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628792>
- An, B. A., Shen, Y., Voordouw, J., Voordouw, G. (2019). Halophilic Methylophilic Methanogens May Contribute to the High Ammonium Concentrations Found in Shale Oil and Shale Gas Reservoirs. *Frontiers in Energy Research*, 7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00023>
- Baena, S., Fardeau, M. L., Labat, M., Ollivier, B., García, J. L., Patel, B. K. C. (2000). *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 259-264. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-259>
- Bebout, B. M., Hoehler, T. M., Thamdrup, B., Albert, D., Carpenter, S. P., Hogan, M., Turk, K., Des Marais, D. J. (2004). Methane production by microbial mats under low sulphate concentrations. *Geobiology*, 2(2), 87–96. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4677.2004.00024.x>
- Belyakova, E. V., Rozanova, E. P., Borzenkov, I. A., Tourova, T. P., Pusheva, M. A., Lysenko, A. M., Kolganova, T. V. (2006). The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil field. *Microbiology*, 75, 161–171. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020093>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 5037-5044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815631116>
- Borton, M. A., Hoyt, D. W., Roux, S., Daly, R. A., Welch, S. A., Nicora, C. D., Purvine, S., Eder, E. K., Hanson, A. J., Sheets, J. M., Morgan, D. M., Wolfe, R. A., Sharma, S., Carr, T. R., Cole, D. R., Mouser, P. J., Lipton, M. S., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C. (2018). Coupled laboratory and field investigations resolve microbial interactions that underpin persistence in hydraulically fractured shales. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(28), E6585–E6594. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800155115>
- Bradley, A. S., Leavitt, W. D., Johnston, D. T. (2011). Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology*, 9(5), 446–457. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00292.x>
- Brown, S. D., Begemann, M. B., Mormile, M. R., Wall, J. D., Han, C. S., Goodwin, L. A., Pitluck, S., Land, M. L., Hauser, L. J., Elias, D. A. (2011). Complete Genome Sequence of the Haloalkaliphilic, Hydrogen-Producing Bacterium *Halanaerobium hydrogeniformans*. *Journal of Bacteriology*, 193 (14), 3682–3683. <https://doi.org/10.1128/jb.05209-11>

- 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. *Microbial Ecology*, 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. *BioRxiv*. <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. *Science of the Total Environment*, 758, 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143581>
- Chen, L. X., Méndez-García, C., Dombrowski, N., Servín-Garcidueñas, L. E., Eloe-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. *The ISME Journal*, 12, 756–775. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0002-z>
- Des Marais, D.J. (2003). Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biological Bulletin*, 204:160–167. <https://doi.org/10.2307/1543552>
- Dong, Y., Sanford, R. A., Boyanov, M. I., Kemner, K. M., Flynn, T. M., O’Loughlin, E. J., Chang, Y., Locke, R. A., Weber, J. R., Egan, S. M., Mackie, R. I., Cann, I., Fouke, B. W. (2016). *Orenia metallireducens* sp. nov. Strain Z6, a Novel Metal-Reducing Member of the Phylum Firmicutes from the Deep Subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6440–6453. <https://doi.org/10.1128/aem.02382-16>
- 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 Ecology and Evolution*, 4, 1111–1119. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12114>
- Escalante, A. E. (2007). Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas, Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México. DF. 393-424.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., Sánchez-Flores, A. 2015. The road to Metagenomics: from Microbiology to DNA Sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers Genetics*, 6:348. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>
- 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. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01284>
- 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. *International Microbiology*, 15:33-41. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.156>
- García-Maldonado, J., Bebout, B., Craig, R., López-Cortés, A. (2015). Evidence of Novel phylogenetic lineages of methanogenic archaea from hypersaline microbial mats. *Microbial Ecology*, 69:106-117. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0473-7>

- García-Maldonado, J., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Bebout, B., Sanchez-Flores, A., López-Cortés, A. (2018). Bacterial and archaeal profiling of hypersaline microbial mats and endoevaporitas, under natural conditions and methanogenic microcosm experiments. *Extremophiles*, 22, 903-916. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1047-2>
- García-Maldonado, J.Q.; Latisnere-Barragán, H.; Escobar-Zepeda, A.; Cadena, S.; Ramírez-Arenas, P.J.; Vázquez-Juárez, R.; Rojas-Contreras, M.; López-Cortés, A. (2023). Revisiting Microbial Diversity in Hypersaline Microbial Mats from Guerrero Negro for a Better Understanding of Methanogenic Archaeal Communities. *Microorganisms*, 11, 812. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030812>
- 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.
- Hardy, J., Bonin, P., Lazuka, A., Gonidec, E., Guasco, S., Valette, C., Lacroix, S., Cabrol, L. (2021). Similar methanogenic shift but divergent syntrophic partners in anaerobic digesters exposed to direct versus successive ammonium additions. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e0080521. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00805-21>.
- 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. *The ISME Journal*, 7, 50–60. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.79>
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., Shoun, H. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1601–1609. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1601>
- Heijthuijsen, J. H., Hansen T. A. (1989). Betaine fermentation and oxidation by marine Desulfuromonas strains. *Applied Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.55.4.965-969.1989>
- Hoehler, T. M., Bebout, B. M., Des Marais, D. J. (2001). The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature*, 412, 324–327. <https://doi.org/10.1038/35085554>
- Hug, L. A., y Co, R. (2018). It Takes a Village: Microbial Communities Thrive through Interactions and Metabolic Handoffs. *mSystems*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00152-17>
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1729-1735. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1729>.
- Inagaki, F., Kuypers, M. M. M., Tsunogai, U., Ishibashi, J., Nakamura, K., Treude, T., Ohkubo, S., Nakaseama, M., Gena, K., Chiba, H., Hirayama, H., Nunoura, T., Takai, K., B.Jorgensen, B., Horikoshi, K., Boetius, A. (2006). Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 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. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 7224–7235. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7224-7235.2003>
- Jumas-Bilak, E.; Roudiere, L.; Marchandin, H. (2009). Description of Synergistetes phyl. nov. and emended description of the Phylum Deferribacteres and of the family Syntrophomonadaceae, Phylum Firmicutes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1028–1035. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006718-0>
- Katayama, T., Nobu, M. K., Kusada, H., Meng, X.-Y., Hosogi, N., Uematsu, K., Yoshioka, H., Kamagata, Y., Tamaki, H. (2020). Isolation of a member of the candidate phylum “Atribacteria” reveals a unique cell membrane structure. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20149-5>
- Kelley, C. A., Chanton, J.P., Bebout, B. M. (2015). Rates and Pathways of methanogenesis in hypersaline environments as determined by ¹³C-labeling. *Biogeochemistry*, 126, 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10533-015-0161-9>
- Kelley, C. A., Poole, J. A., Tazaz, A. M., Chanton, J. P., Bebout, B. M. (2012). Substrate limitation for methanogenesis in hypersaline environments. *Astrobiology*, 12:89–97. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0703>
- Kim, S.G., Bae, H.S., Oh, H.M., Lee, S.T. (2003). Isolation and characterization of novel halotolerant and/or halophilic denitrifying bacteria with versatile metabolic pathways for the degradation of trimethylamine. *FEMS Microbiology Letters*, 225(2), 263–269. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00530-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00530-5)
- King G. M. (1984). Metabolism of trimethylamine, choline, and glycine betaine by sulfate-reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. *Applied Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.48.4.719-725.1984>
- King, G. M. (1988). Methanogenesis from Methylated Amines in a Hypersaline Algal Mat. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 130–136. <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. *Applied Environmental Microbiology*, 45, 1848–1853. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1848-1853.1983>
- Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., McIlroy, S. J., Nierychlo, M., Karst, S. M., Albertsen, M., Nielsen, P. H. (2016). Genomic insights into members of the candidate phylum Hyd24-12 common in mesophilic anaerobic digesters. *The ISME Journal*, 10(10), 2352–2364. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.43>
- Kobayashi, T., Kimura, B., Fujii, T. (2000). *Haloanaerobium fermentans* sp. nov., a strictly anaerobic, fermentative halophile isolated from fermented puffer fish ovaries. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 4, 1621–1627. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1621>
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology?. *The ISME Journal*, 3 (11), 1223–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88>
- Lechtenfeld, M., Heine, J., Sameith, J., Kremp, F., Müller, V. (2018). Glycine betaine metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14389>
- 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>
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3685–3695. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3685-3695.2006>
- Li, L., Zhang, W., Zhang, S., Song, L., Sun, Q., Zhang, H., Xiang, H., Dong, X. (2021). Bacteria and Archaea Synergistically Convert Glycine Betaine to Biogenic Methane in the Formosa Cold Seep of the South China Sea. *mSystems*, 6:10.1128/msystems.00703-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00703-21>
- Lieb Gott, P. P., Joseph, M., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Falsen, E., Chamkh, F., Qatibi, A., Labat, M. (2008). *Clostridiisalibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 61–67. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65182-0>
- Liu, Q. Q., Li, X. L., Rooney, A. P., Du, Z. J., Chen, G. J. (2014). *Tangfeifania diversioriginum* gen. nov., sp. nov., a representative of the family Draconibacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3473–3477. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066902-0>
- Liu, Y., Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Annals New York Academy Sciences*, 1125, 171-189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- López-Cortés, A. (1991). Geomicrobiología Ambiental. En: Ortega, A. y Arriaga, L. (Eds.). La Reserva de la Biosfera El Vizcaino en la Península de Baja California. Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C. México. La Paz, BCS. 317.
- López-Cortés, A. Estela, L., Bacilio, M., Bashan, Y. (2015). La investigación en Microbiología Ambiental en Baja California: Importancia y Usos. *Recursos Naturales y Sociedad*, Vol. 1(7), 83-89. <https://doi.org/10.18846/RENAYSOC.2015.01.01.01.0007>
- Lozupone, C., y Knight, R. (2005). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8228-8235.2005>
- 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*, 19–77. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_5
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. (2015). BROCK, Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S.A. 14va edición. 90-101; 235-240; 380; 434-460; 682-688; 723-728.
- 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*. 283-309. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_12
- McInerney, M. J., Bryant, M. P. Pfennig, N. (1979). Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Archives of Microbiology*, 122, 129–135. <https://doi.org/10.1007/BF00411351>

- Mouné, S., Eatock, C., Matheron, R., Willison, J. C., Hirschler, A., Herbert, R., Caumette, P. (2000). *Orenia salinaria* sp. nov., a fermentative bacterium isolated from anaerobic sediments of Mediterranean salterns. *International Journal of Systematic and Microbiology*, 50(2), 721–729. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-721>
- Narihiro, T., Nobu, M. K., Kim, N.K., Kamagata, Y., Liu, W.T. (2014). The nexus of syntrophy-associated microbiota in anaerobic digestion revealed by long-term enrichment and community survey. *Environmental Microbiology*, 17(5), 1707–1720. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12616>
- Nesbo, C. L., L'Haridon, S., Stetter, K. O., Doolittle, W. F. (2001). Phylogenetic Analyses of Two “Archaeal” Genes in *Thermotoga maritima* Reveal Multiple Transfers Between Archaea and Bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18(3), 362–375. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev>
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Mei, R., Kamagata, Y., Lee, P. K. H., Lee, P.-H., McInerney, M. J., Liu, W.-T. (2020). Catabolism and interactions of uncultured organisms shaped by ecothermodynamics in methanogenic bioprocesses. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00885-y>
- 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. *The ISME Journal*, 9, 1710–1722. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.256>
- 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. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 56, 169–180. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63941-0>
- Ollivier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Magot, M., Patel, B. K. C., Prensier, G., Garca, J. L. (1998). *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *International Journal Systematic Bacteriology*, 48, 821–828. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-821>
- Oren, A. (1990). Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58(4), 291–298. <https://doi.org/10.1007/bf00399342>
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*, 13, 1908–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x>
- 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. *Geobiology*, 6:376–393. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00166.x>
- 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. *Biotechnology Equipment*, 35, 1-10. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1840437>
- Preiss, J. (1984). Bacterial Glycogen Synthesis and its Regulation. *Annual Review of Microbiology*, 38(1), 419–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.38.100184.002223>
- Qiu, Y., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y. (2008). *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the First Cultured Anaerobe Capable of Degrading Phenol to Acetate in Obligate Syntrophic Associations with a Hydrogenotrophic Methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74. <https://doi.org/10.1128/AEM.02378>
- Rainey, F. A., Zhilina, T. N., Boulygina, E. S., Stackebrandt, E., Tourova, T. P., Zavarzin, G. A. (1995). The Taxonomic Status of the Fermentative Halophilic Anaerobic Bacteria: Description of Haloanaerobiales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further Taxonomic Rearrangements at the Genus and Species Level. *Anaerobe*, 1(4), 185–199. <https://doi.org/10.1006/anae.1995.1018>
- Ramírez-Arenas, P. J. (2021). Análisis de comunidades de bacterias y arqueas en tapetes microbianos hipersalinos, con énfasis en arqueas metanógenas metilotróficas dependientes de hidrogeno. Tesis Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 1- 19.
- Robertson, C. E., Spear, J. R., Harris, J. K., Pace, N.R. (2008). Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1801–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.01811-08>
- Sagulenko, E., Morgan, G. P., Webb, R. I., Yee, B., Lee, K. C., Fuerst, J. A. (2014). Structural Studies of Planctomycete *Gemmata obscuriglobus* Support Cell Compartmentalisation in a Bacterium. *PLoS ONE*, 9 (3): e91344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091344>
- 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 471–493. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_59
- Sekiguchi, Y., Imachi, H., Susilorukmi, A., Muramatsu, M., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y. (2006). *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1621–1629. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64112-0>
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H. (2000). *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 2,771-779. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-771>.
- Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. (2003). *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (6), 1843–1851. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02699-0>

- Shade, A. (2017). Diversity is the question, not the answer. *The ISME Journal*, 11, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.118>
- Shi, Y., Ming, H., Ji, F., Shi, T., Jin, Y., Su, J., Fan, J. (2021). Effect of salinity on the community structure and ecological functions of Archaea in Liaohe Estuary. Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 675. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/675/1/012016>
- 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. *Environmental Microbiology*, 10:386–394. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01459.x>
- 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). *Geomicrobiology Journal*, 28, 83–95. <https://doi.org/10.1080/01490451003653102>
- Strom, A. R., Olafsen, J. A., Larsen, H. (1979). Trimethylamine Oxide: A Terminal Electron Acceptor in Anaerobic Respiration of Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 112(2), 315–320. <https://doi.org/10.1099/00221287-112-2-315>
- Tsai, C. R., García, J. L., Patel, B. K. C., Cayol, J.L., Baresi, L., Mah, R. A. (1995). *Haloanaerobium alcaliphilum* sp. nov., an Anaerobic Moderate Halophile from the Sediments of Great Salt Lake, Utah. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 301–307. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-301>
- Valenzuela-Gonzalez, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- 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)
- Wang, X., Cao, A., Zhao, G., Zhou, C., Xu, R. (2017). Microbial community structure and diversity in a municipal solid waste landfill. *Waste Management*, 66, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.023>
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A., Falsen, E., Moore, E., Lawson, P. A. (2010). *Peptostreptococcus russellii* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61 (8), 1875–1879. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023762-0>
- Xu, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, 15 (7), 1713–1731. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2006.02882.x>
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y. (2007). *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2299–2306. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65098-0>
- 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>

- Zhang, X., Huang, Y., Liu, Y., Xu, W., Pan, J., Zheng, X., Du, H., Zhang, C., Lu, Z., Zou, D., Liu, Z., Cai, M., Xiong, J., Zhu, Y., Dong, Z., Jiang, H., Dong, H., Jiang, J., Luo, Z., Huang, L., Li, M. (2022). Ancient Respiratory System in the Widespread Sedimentary Archaea Thermoprofundales. *Molecular Biology and Evolution*, 39(10). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac213>
- Zhou, Z., Liu, Y., Lloyd, K. G., Pan, J., Yang, Y., Gu, J.-D., Li, M. (2018). Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, thermoprofundales (MBG-D archaea). *The ISME Journal*, 13, 885–901. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0321-8>

11. ANEXO

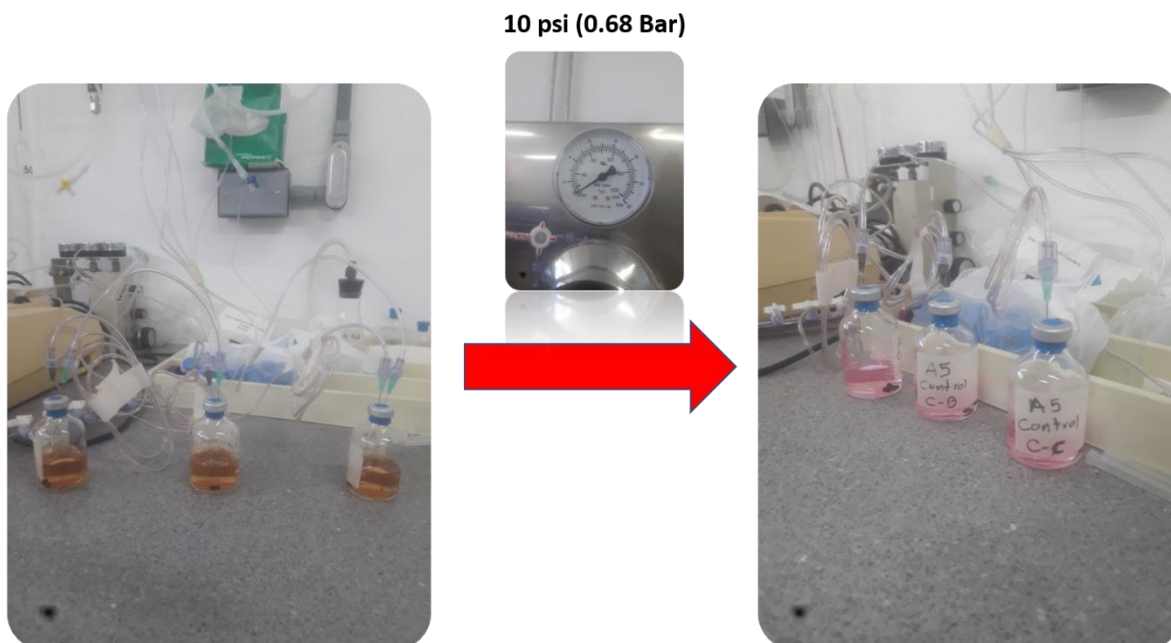
Anexo A.-Tabla A. Calendario de recolección de muestras de gas para su posterior análisis en cromatógrafo de gases (GC-FID).

A4N5	A5
Miércoles 24 de mayo	
	Lunes 29 de mayo
Miércoles 7 de junio	
	Lunes 12 de junio
Miércoles 21 de junio	
Posterior a pulso de sustrato orgánico y obtención del núcleo de tapete microbiano de cada frasco	Lunes 26 de junio
Miércoles 5 de julio	Posterior a pulso de sustrato orgánico y obtención del núcleo de tapete microbiano de cada frasco
	Lunes 10 de julio
Miércoles 19 de julio	
	Lunes 24 de julio
Miércoles 2 de agosto	
	Lunes 7 de agosto

Se montaron de manera exitosa 9 réplicas de microcosmos para cada área (A4N5 y A5) de ESSA, dando un total de 18 frascos. Los microcosmos mostraron una coloración naranja en los tratamientos problema por la adición de extracto de levadura (1%), mientras que en el caso del tratamiento control la adición de resazurina como indicador redox mostro una coloración rosa, señalando inicialmente la ausencia de condiciones anóxicas dentro de los microcosmos (Anexo 1 Figura B). Esta tonalidad cambio al purgarse los frascos y al adicionar una atmosfera inicial de nitrógeno molecular gaseoso (N₂) a una presión de 10 psi por dos minutos (Anexo 1 Figura C), de esta manera se comprobó las condiciones anóxicas dentro del sistema antes de iniciar con su incubación a 28 °C.



Anexo B.-Figura B. Montaje de frascos con tratamientos control y tratamientos problema con adición de glucosa y betaína de las áreas A4N5 y A5 de la exportadora de sal (ESSA), Guerrero Negro, Baja California Sur.



Anexo C.-Figura C. Adición de atmosfera inicial de Nitrógeno (N_2) a los microcosmos de A4N5 y A5.

Se procedió con la cuantificación de las muestras de ADN genómico mediante espectrofotometría estándar mediante el uso de NanoDrop, para lo que se elaboraron diluciones de 1:5 de las 30 muestras (Tapete y Caldo-fase acuosa) de las áreas A4N5 y A5, donde los resultados mostraron la presencia de ADN suficiente para llevar a cabo la reacción de PCR (Anexo 1 Tabla B). Con estos

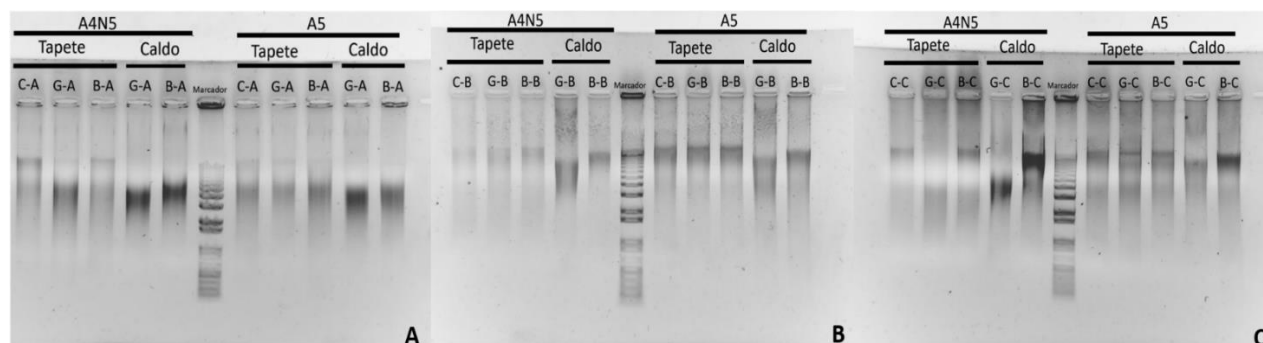
resultados se realizaron las diluciones del stock madre de las muestras para obtener una solución de trabajo y proceder con la elaboración de los productos de PCR.

Anexo D.-Tabla B. Concentración y pureza de ADN genómico obtenida con el espectrofotómetro NanoDrop.

Muestra	Ácido nucleico (ng/μl) Dilución 1:5	Pureza 260/280	Concentración stock madre (ng/μl)
A4N5 C-A Tapete	4.8	2.07	24
A4N5 G-A Tapete	6	1.88	30
A4N5 B-A Tapete	3.8	1.79	19
A4N5 G-A Caldo-fase acuosa	16.9	1.96	84.5
A4N5 B-A Caldo-fase acuosa	8.6	1.97	43
A5 C-A Tapete	5.2	2.03	26
A5 G-A Tapete	3.7	1.97	18.5
A5 B-A Tapete	9.5	1.92	47.5
A5 G-A Caldo-fase acuosa	18.3	1.91	91.5
A5 B-A Caldo-fase acuosa	16.7	1.65	83.5
A4N5 C-B Tapete	1.7	1.87	8.5
A4N5 G-B Tapete	2.1	2.15	10.5
A4N5 B-B Tapete	2.1	1.93	10.5
A4N5 G-B Caldo-fase acuosa	27.6	1.85	138
A4N5 B-B Caldo-fase acuosa	10.7	1.87	53.5
A5 C-B Tapete	10.8	1.9	54
A5 G-B Tapete	5.4	2.03	27
A5 B-B Tapete	8.9	1.73	44.5
A5 G-B Caldo-fase acuosa	35.3	1.83	176.5
A5 B-B Caldo-fase acuosa	20.9	1.8	104.5
A4N5 C-C Tapete	1.3	2.87	6.5
A4N5 G-C Tapete	1.7	2.21	8.5
A4N5 B-C Tapete	1.6	2.17	8
A4N5 G-C Caldo-fase acuosa	35.1	1.84	175.5
A4N5 B-C Caldo-fase acuosa	31.3	1.87	156.5
A5 C-C Tapete	8.1	1.88	40.5
A5 G-C Tapete	11.3	2	56.5
A5 B-C Tapete	11.2	1.93	56
A5 G-C Caldo-fase acuosa	41	1.86	205
A5 B-C Caldo-fase acuosa	23.5	1.88	117.5

La calidad del ADN genómico de las 30 muestras (Tapete y Caldo-fase acuosa) de área A4N5 y A5 se verifico por medio de un gel de agarosa al 1%, con el que se confirmó buena calidad en las extracciones, como se observa en la Anexo 1 Figura D. Donde se aprecian bandas visibles, siendo evidente una mayor calidad de ADN genómico en el caso de las muestras de Caldo-fase acuosa

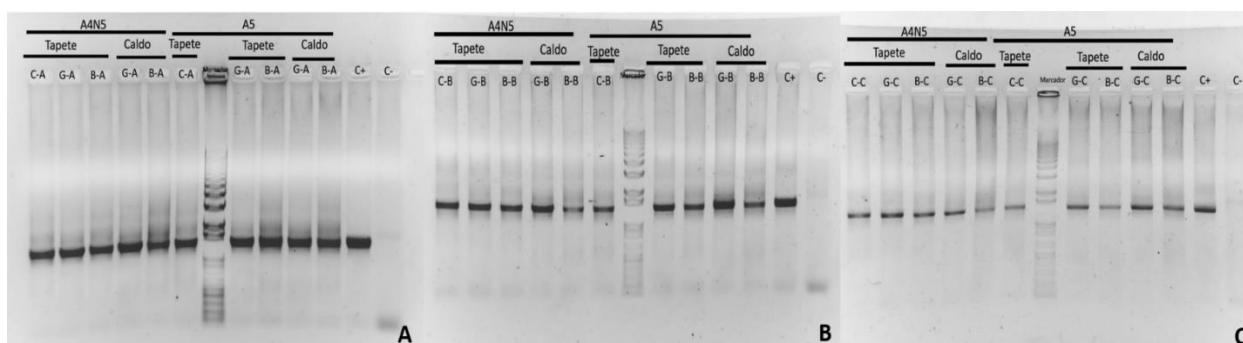
que muestran bandas más intensas, además, en todas las extracciones se aprecia mayor cantidad de ADN genómico en la zona de alto peso molecular. Las muestras fueron preservadas en RNAlater para su posterior uso en la elaboración de amplicones.



Anexo E.-Figura D. Extracción de ADN de núcleos de Tapete microbiano y Caldo-fase acuosa de cultivo de experimento de microcosmos de A4N5 y A5 de las réplicas “A”, “B” y “C”. Ejemplo: C-A: control A; G-A: glucosa A

Anexo F.-Secuenciación de amplicones que codifica para 16S ARNr

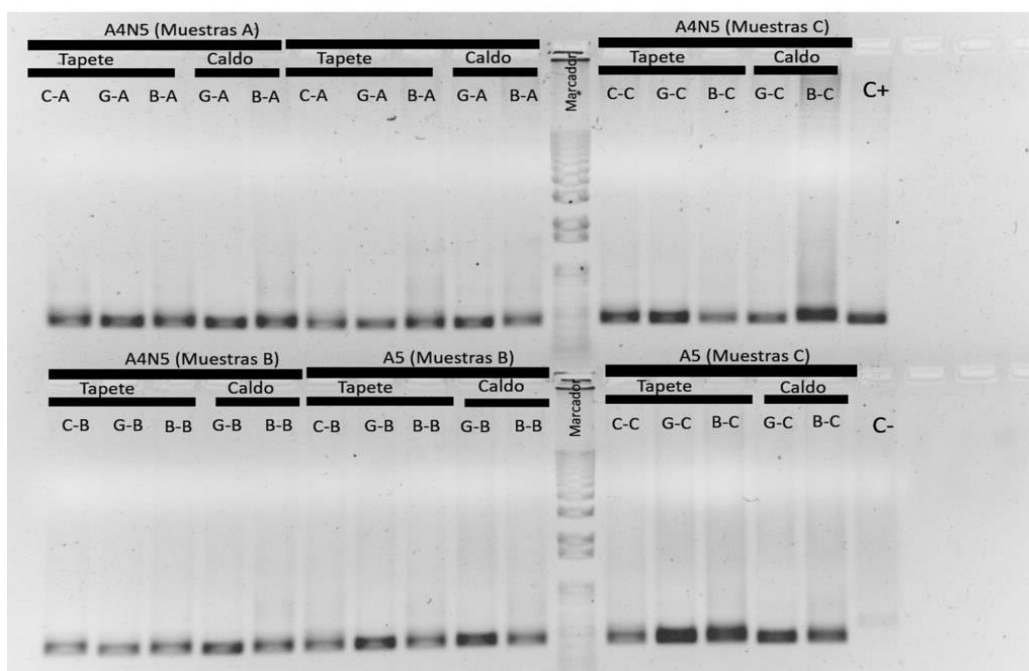
Se llevaron a cabo ensayos de PCR preliminares a partir de las extracciones de ADN genómico de los núcleos de Tapete microbiano y el Caldo-fase acuosa de cultivo de los tratamientos Control (C), Glucosa (G) y Betaína (B) y sus respectivas réplicas (“A”, “B” y “C”) del experimento de microcosmos de las áreas A4N5 y A5, con la finalidad de detectar potenciales inhibiciones de reacción. Siendo el caso del tratamiento Control el único del que no se elaboraron productos de PCR a partir de Caldo-fase acuosa de cultivo. Para ello los primeros ensayos consistieron en la amplificación del 16S ARNr largo (16S-long) de aproximadamente 1492 pb utilizando los primers 8F y 1492 R, donde las 30 muestras mostraron una óptima amplificación al apreciarse bandas visibles y con un tamaño cercano a los 155 pb tomando de referencia el marcador molecular (Anexo 1 Figura E). Estos resultados mostraron la óptima calidad de las extracciones y la capacidad de las muestras de amplificar las 9 regiones hipervariables del gen 16S ARNr.



Anexo G.-Figura E. Ensayo preliminar de amplificación de las 9 regiones hipervariables del gen 16S ARNr de A4N5 y A5 de las réplicas “A”, “B” y “C” utilizando los primers 8F-1492R.

Posteriormente se llevó un segundo ensayo de PCR preliminares a partir de las extracciones de ADN genómico de los núcleos de Tapete microbiano y el Caldo-fase acuosa de cultivo de los tratamientos Control (C), Glucosa (G) y Betaína (B) y sus respectivas réplicas (“A”, “B” y “C”) del experimento de microcosmos de las áreas A4N5 y A5, con la finalidad de detectar potenciales inhibiciones de reacción. Siendo el caso del tratamiento Control el único del que no se elaboraron productos de PCR a partir de Caldo-fase acuosa de cultivo. Para este nuevo ensayo preliminar se utilizaron los primers 515F y 926R para amplificar la región hipervariable V4-V6 con un tamaño promedio de 400 pb, mostrando nuevamente los resultados en gel de agarosa al 1% una óptima amplificación de todas las muestras al apreciarse bandas visibles y con un tamaño aproximado de 400 pb tomando de referencia el marcador molecular (Anexo 1 Figura F). Estos resultados mostraron una óptima calidad de las extracciones y la capacidad de las muestras de amplificar las regiones V4-V6 del gen 16S rRNA.

La visualización de los amplicones en gel de agarosa se aprecian con un acomodo conforme al área y a la muestra. Observándose en los geles las “Muestras A” en los primeros 10 carriles de la fila superior izquierda seguido del marcador molecular, “Muestras B” en los primeros 10 carriles de la fila inferior izquierda seguido también del marcador molecular. Después de los carriles cargados con el marcador molecular se encuentran las “Muestras C” divididas por sus respectivas áreas en los carriles superiores (A4N5) e inferiores (A5). Siendo los últimos carriles cargados con los controles positivo y negativo respectivamente.



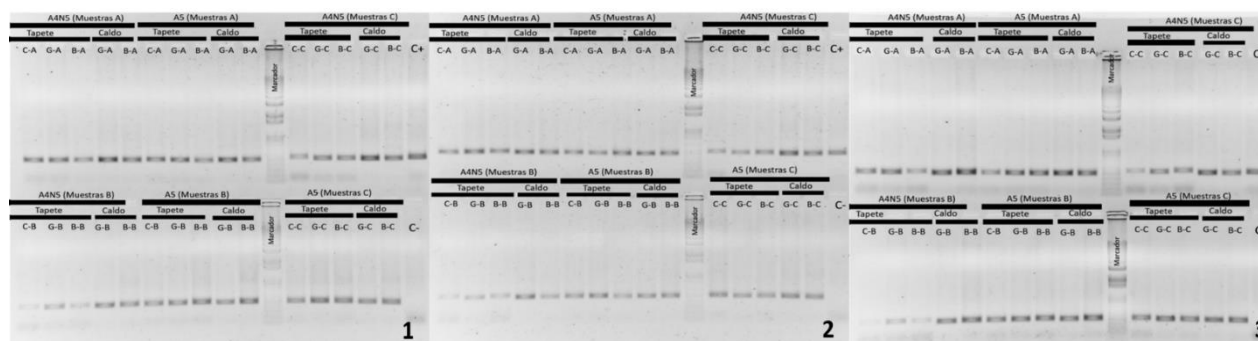
Anexo H.-Figura F. Ensayo preliminar de amplificación de las regiones hipervariables V4-V6 del gen 16S ARNr de las áreas A4N5 y A5 de las réplicas “A”, “B” y “C” utilizando los primers 515F-926R.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de PCR finales para secuenciación. Para ello se realizaron 3 réplicas de productos de PCR de 25 microlitros para cada caso (Anexo 1 Tabla C). Siendo utilizados 5 microlitros de cada replica de amplicones para visualizar en gel de agarosa al 1% (Anexo 1 Figura G). Quedando por lo tanto 20 microlitros de cada una de las réplicas, las cuales finalmente se juntaron para dar una cantidad total de 60 microlitros. A excepción de 2 casos (A4N5 C-Tapete “A” y A5 C-Tapete “C”) donde se llevaron a cabo más réplicas de amplicones. A partir de esta cantidad total en microlitros se elaboraron diluciones de 1:10 de cada caso para su cuantificación en Nanodrop con la cual se determinó su concentración y se confirmó su calidad para secuenciación (Anexo 1 Tabla C).

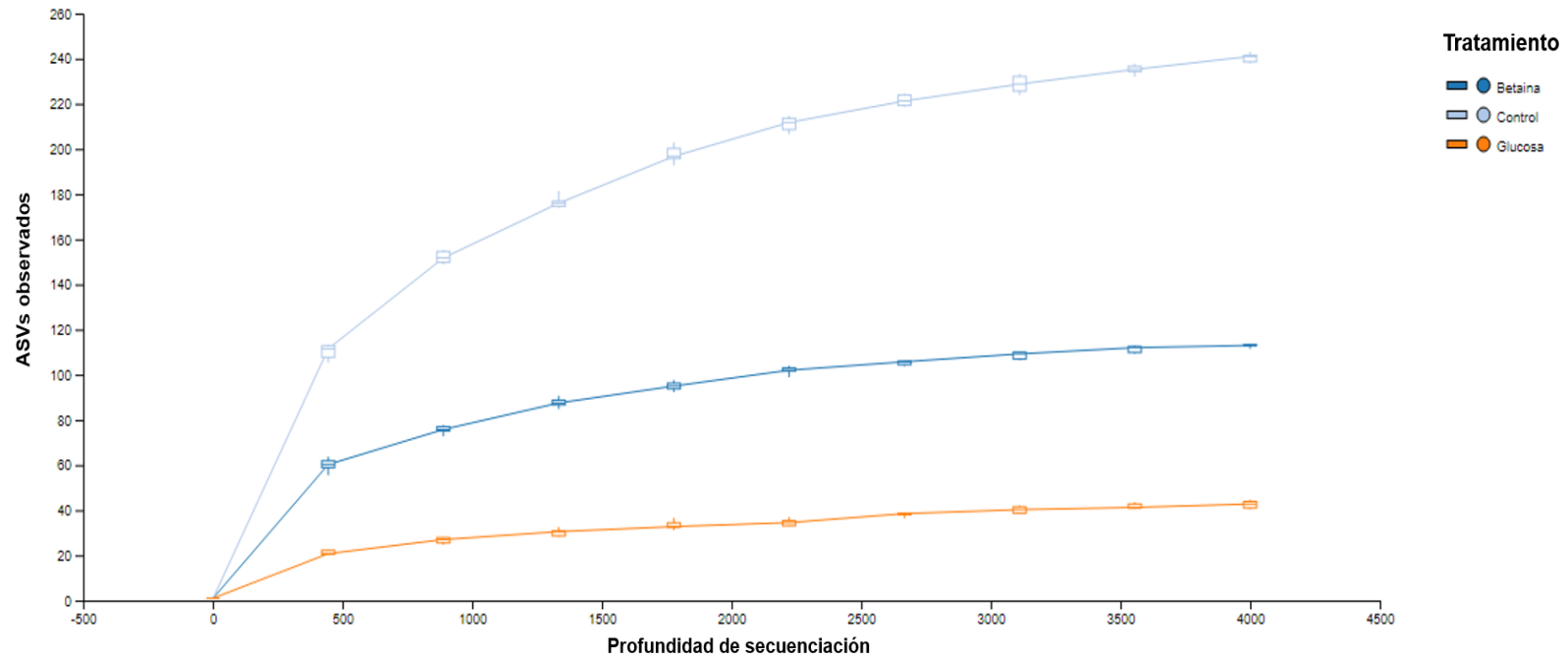
Anexo I.-Tabla C. Cuantificación de amplicones del gen 16S ARNr en Nanodrop utilizando los primers 515F - 926R con adaptadores para secuenciación en equipo Miseq.

Productos de PCR	Ácido nucleico (ng/μl) 1:10	Concentración stock madre (ng/μl)	Cantidad aproximada (μl)	Concentración final (ng)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
A4N5 C-Tapete "A"	5.4	54	80	4320	0.109	0.054	2.01	1.32
A4N5 G-Tapete "A"	11.4	114	60	6840	0.228	0.1	2.29	2.04
A4N5 B-Tapete "A"	9.1	91	60	5460	0.182	0.08	2.28	1.66
A4N5 G-Caldo-fase acuosa "A"	7.6	76	60	4560	0.152	0.074	2.05	1.41
A4N5 B-Caldo-fase acuosa "A"	13.4	134	60	8040	0.268	0.117	2.29	0.94
A5 C-Tapete "A"	14.8	148	60	8880	0.297	0.142	2.09	1.92
A5 G-Tapete "A"	6.5	65	60	3900	0.129	0.058	2.23	1.56
A5 B-Tapete "A"	7.7	77	60	4620	0.153	0.067	2.27	3.86
A5 G-Caldo-fase acuosa "A"	21.9	219	60	13140	0.437	0.202	2.17	1.89
A5 B-Caldo-fase acuosa "A"	12.3	123	60	7380	0.247	0.114	2.16	1.34
A4N5 C-Tapete "B"	14.2	142	60	8520	0.285	0.136	2.09	1.69
A4N5 G-Tapete "B"	18.7	187	60	11220	0.375	0.165	2.27	2.34
A4N5 B-Tapete "B"	20.5	205	60	12300	0.409	0.181	2.26	2.94
A4N5 G-Caldo-fase acuosa "B"	11.4	114	60	6840	0.229	0.094	2.42	2
A4N5 B-Caldo-fase acuosa "B"	19	190	60	11400	0.38	0.169	2.25	1.68
A5 C-Tapete "B"	11.8	118	60	7080	0.236	0.114	2.07	1.64
A5 G-Tapete "B"	15	150	60	9000	0.301	0.145	2.07	1.94
A5 B-Tapete "B"	15.2	152	60	9120	0.303	0.137	2.21	2.11
A5 G-Caldo-fase acuosa "B"	12.7	127	60	7620	0.254	0.119	2.13	1.31
A5 B-Caldo-fase acuosa "B"	12.4	124	60	7440	0.248	0.112	2.21	1.68
A4N5 C-Tapete "C"	15.2	152	60	9120	0.303	0.145	2.09	1.86
A4N5 G-Tapete "C"	23.6	236	60	14160	0.473	0.218	2.17	1.51
A4N5 B-Tapete "C"	14.8	148	60	8880	0.297	0.133	2.23	2.36
A4N5 G-Caldo-fase acuosa "C"	9.4	94	60	5640	0.187	0.079	2.38	1.86
A4N5 B-Caldo-fase acuosa "C"	14.7	147	60	8820	0.294	0.133	2.21	2.08
A5 C-Tapete "C"	10.6	106	100	10600	0.211	0.098	2.17	2
A5 G-Tapete "C"	11	110	60	6600	0.22	0.097	2.27	2.3
A5 B-Tapete "C"	13.7	137	60	8220	0.273	0.125	2.19	2.05
A5 G-Caldo-fase acuosa "C"	15.7	157	60	9420	0.314	0.143	2.19	1.81
A5 B-Caldo-fase acuosa "C"	13.6	136	60	8160	0.271	0.118	2.31	2.37

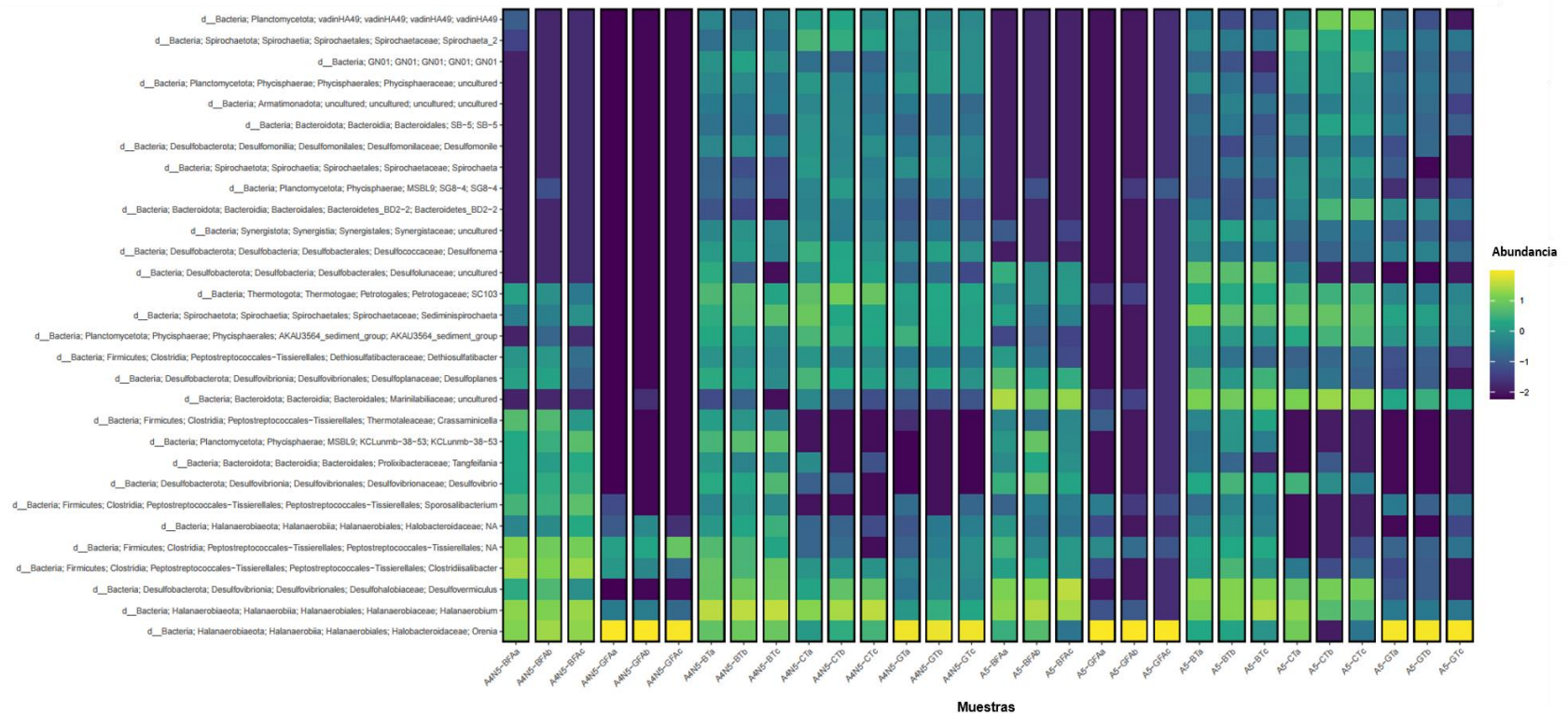
Finalmente, la visualización de las tres réplicas de amplicones en gel de agarosa (1%) a partir de las extracciones de ADN genómico de los núcleos de Tapete microbiano y el Caldo-fase acuosa de cultivo de los tratamientos Control (C), Glucosa (G) y Betaína (B) utilizando los primers 515F y 926R con sus respectivos adaptadores para secuenciación en equipo Miseq, mostraron una óptima amplificación de todas las muestras al apreciarse bandas visibles y con un tamaño aproximado de 400 pb tomando de referencia el marcador molecular (Thermo Cientific 1 kb plus Ladder). Estos resultados mostraron la óptima calidad de las extracciones y la capacidad de las muestras de amplificar con los adaptadores para su secuenciación en equipo Miseq (Figura 10). La visualización de los amplicones en gel de agarosa se aprecian con un acomodo conforme al área y a la muestra. Observándose en los geles las “Muestras A” en los primeros 10 carriles de la fila superior izquierda seguido del marcador molecular, “Muestras B” en los primeros 10 carriles de la fila inferior izquierda seguido también del marcador molecular. Después de los carriles cargados con el marcador molecular se encuentran las “Muestras C” divididas por sus respectivas áreas en los carriles superiores (A4N5) e inferiores (A5). Siendo los últimos carriles cargados con los controles positivo y negativo respectivamente.



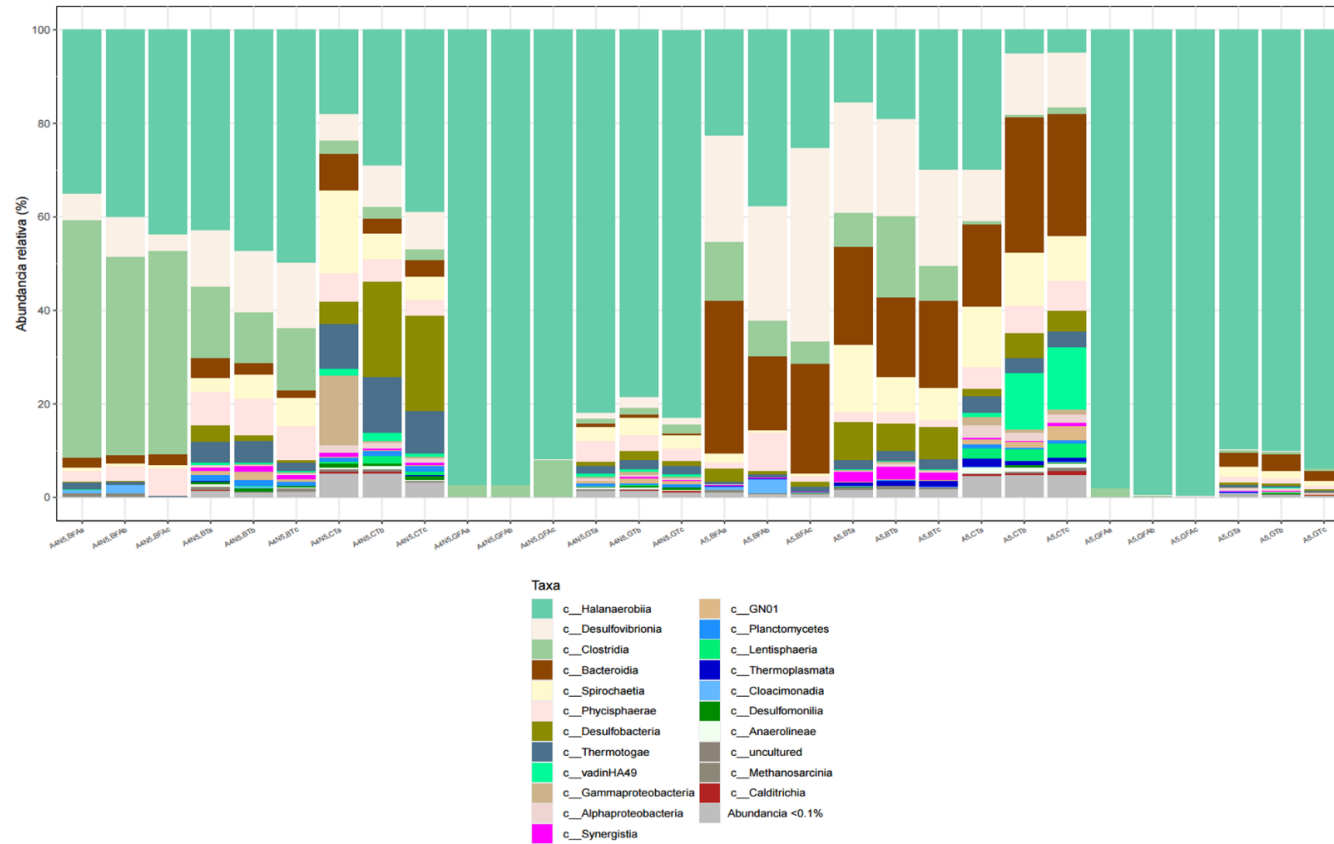
Anexo J.-Figura G. Amplificación final de la región hipervariable V4-V6 del gen 16S de las áreas A4N5 y A5 utilizando los primers con sus respectivos adaptadores para su secuenciación en equipo Miseq 515F-926R.



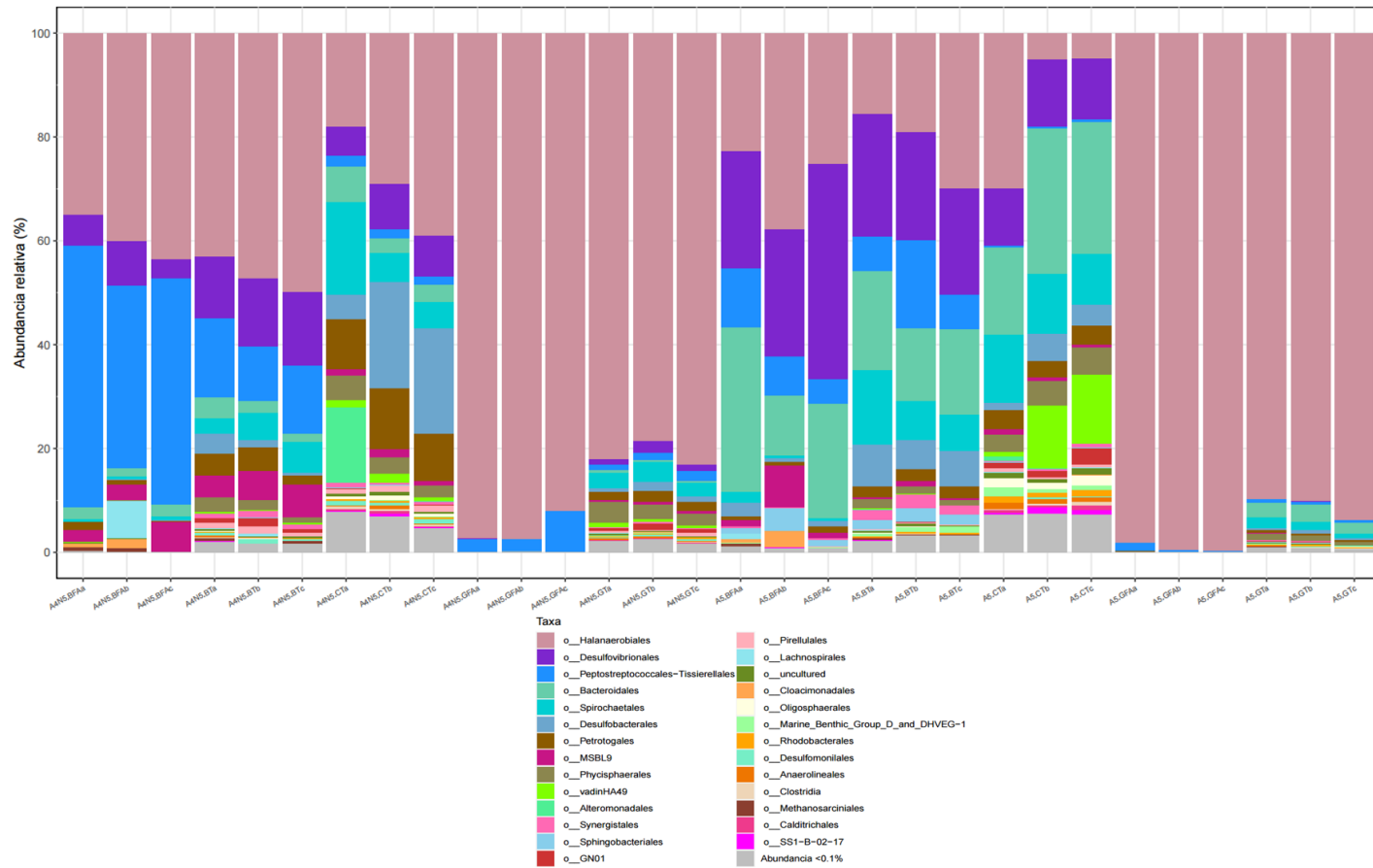
Anexo K.-Figura A. Curvas de alfa rarefacción de todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5. Se observa que las curvas están muy cercanas a la asíntota, lo que nos permite inferir que la profundidad de la secuenciación fue óptima.



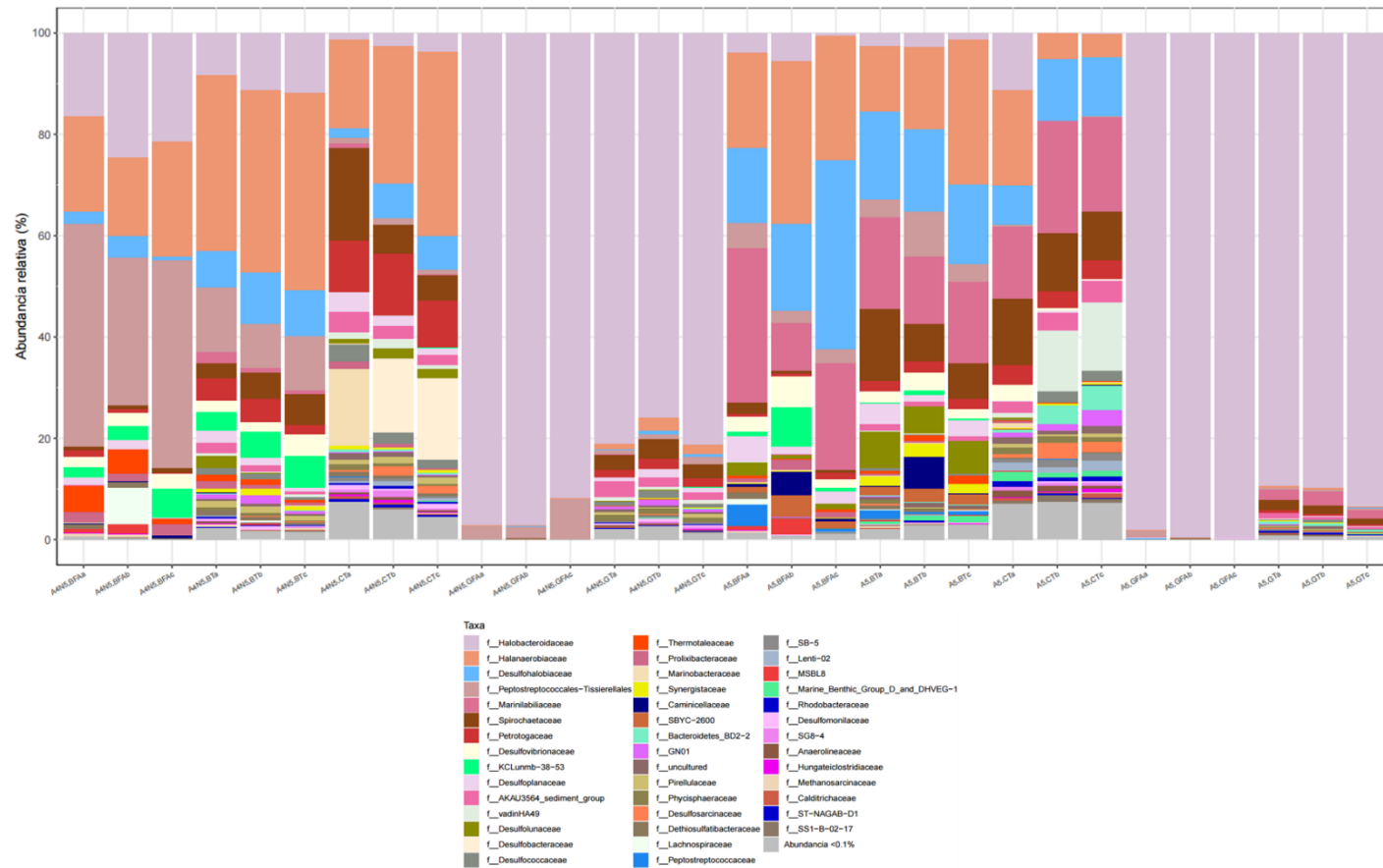
Anexo L-Figura B. Heatmap de la abundancia relativa de Bacteria y Arquea hasta nivel género de los taxos más representativos de las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) and Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.



Anexo M.-Figura C. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel Clase en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agrupan on en “Abundancia <0.1%”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.



Anexo N.-Figura D. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel Orden en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agrupan on en “Abundancia <0.1%”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, Tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.



Anexo O.-Figura E. Abundancia relativa de Bacteria y Arquea a nivel Familia en todas las muestras de tratamientos de tapete microbiano de ambientes hipersalinos de los sitios de A4N5 y A5 en el experimento de microcosmos. Los taxa que representan <0.1% se agrupan en “Abundancia <0.1%”. Las nomenclaturas hacen referencia al tipo de muestra, tapete microbiano (T) y Caldo-fase acuosa de cultivo (FA) de los sitios A4N5 y A5 (izquierda a derecha de la figura respectivamente) de las réplicas “a”, “b” y “c”.